

**VALOR DE LA ANGIOGÉNESIS EN RELACIÓN A OTROS FACTORES  
PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE DE MAMA**

**FRANCISCO JAVIER TORRES GÓMEZ**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |         |
|---|---------|
| PRÓLOGO   | pág. 1  |
| INTRODUCCIÓN  | pág. 2  |
| Concepto de angiogénesis                              | pág. 2  |
| La angiogénesis tumoral                               | pág. 2  |
| • Factores estimuladores de la angiogénesis           | pág. 3  |
| • Factores inhibidores de la angiogénesis             | pág. 4  |
| • Factores que actúan directamente en la angiogénesis | pág. 5  |
| Factores pronósticos en el cáncer de mama             | pág. 9  |
| 1. Factores clínicos                                  | pág. 9  |
| 2. Estadío tumoral                                    | pág. 10 |
| 3. Factores morfológicos                              | pág. 10 |

|   |          |
|---|----------|
| • Tipos histológicos  | pág. 11  |
| • Grado histológico combinado   | pág. 14  |
| • Tamaño tumoral y estatus ganglionar axilar                            | pág. 16  |
| • Invasión linfática, vascular y perineural                             | pág. 17  |
| • Necrosis e infiltrados inflamatorios intratumorales y estroma tumoral | pág. 17  |
| • Extensión del componente tumoral intraductal                          | pág. 17  |
| 4. Factores con expresión inmunohistoquímica                            | pág. 17  |
| • Receptores estrogénicos y de progesterona                             | pág. 18  |
| • Ki 67   | pág. 18  |
| • C-erb2  | pág. 19  |
| • Receptor del factor de crecimiento epidérmico                         | pág. 20  |
| • Bcl-2   | pág. 20  |
| • pS2   | pág. 20  |
| • Catepsina D   | pág. 20  |
| 5. Angiogénesis   | pág. 21  |
| <br>  |          |
| MATERIAL Y MÉTODOS  | pág. 24  |
| <br>  |          |
| RESULTADOS  | pág. 27  |
| <br>  |          |
| DISCUSION   | pág. 55  |
| <br>  |          |
| CONCLUSIONES  | pág. 65  |
| <br>  |          |
| BIBLIOGRAFÍA  | pág. 68  |
| <br>  |          |
| GRÁFICOS  | pág. 88  |
| <br>  |          |
| IMÁGENES  | pág. 118 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Distribución de los casos por edades
2. Distribución de los casos por tamaño tumoral
3. Distribución de los casos por grado histológico
4. Estatus ganglionar axilar
5. Correlación entre tamaño y formación tubular tumoral
6. Correlación entre tamaño y grado nuclear tumoral
7. Correlación entre tamaño e índice mitótico tumoral
8. Correlación entre grado histológico y tamaño tumoral
9. Correlación entre grado histológico y tamaño tumoral medio
10. Correlación entre grado histológico y formación tubular tumoral
11. Correlación entre grado histológico y grado nuclear tumoral
12. Correlación entre grado histológico e índice mitótico tumoral

13. Correlación entre estatus ganglionar axilar y tamaño tumoral
14. Correlación entre estatus ganglionar axilar y tamaño tumoral medio
15. Correlación entre estatus ganglionar axilar y formación tubular tumoral
16. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado nuclear tumoral
17. Correlación entre estatus ganglionar axilar e índice mitótico tumoral
18. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado histológico
19. Estudio inmunohistoquímico y estatus ganglionar axilar
20. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y tamaño tumoral
21. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y formación tubular tumoral
22. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y grado nuclear tumoral
23. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos e índice mitótico tumoral
24. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y grado histológico
25. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y estatus ganglionar axilar
26. Correlación entre expresión de p53 y tamaño tumoral
27. Correlación entre expresión de p53 y formación tubular tumoral
28. Correlación entre expresión de p53 y grado nuclear tumoral
29. Correlación entre expresión de p53 e índice mitótico tumoral
30. Correlación entre expresión de p53 y grado histológico tumoral
31. Correlación entre expresión de p53 y estatus ganglionar axilar
32. Correlación entre expresión de c-erb2 y tamaño tumoral
33. Correlación entre expresión de c-erb2 y formación tubular tumoral
34. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado nuclear tumoral
35. Correlación entre expresión de c-erb2 e índice mitótico
36. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado histológico
37. Correlación entre expresión de c-erb2 y estatus ganglionar axilar

38. Comparación entre las DVM obtenidas con los diversos métodos de recuento vascular
39. Curva Cor de los diversos métodos de recuento vascular
40. Correlación entre tamaño y densidad vascular tumoral
41. Correlación entre tamaño y densidad vascular tumoral (por intervalos)
42. Correlación entre formación tubular y densidad vascular tumoral
43. Correlación entre formación tubular y densidad vascular tumoral (por intervalos)
44. Correlación entre grado nuclear y densidad vascular tumoral
45. Correlación entre grado nuclear y densidad vascular tumoral (por intervalos)
46. Correlación entre índice mitótico y densidad vascular tumoral
47. Correlación entre índice mitótico y densidad vascular tumoral (por intervalos)
48. Correlación entre grado histológico y densidad vascular tumoral
49. Correlación entre grado histológico y densidad vascular tumoral (por intervalos)
50. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral
51. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral (por intervalos)
52. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y densidad vascular tumoral
53. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y densidad vascular tumoral (por intervalos)
54. Correlación entre expresión de p-53 y densidad vascular tumoral
55. Correlación entre expresión de p-53 y densidad vascular tumoral (por intervalos)
56. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral
57. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral (por intervalos)

## **INDICE DE TABLAS**

1. Características histológicas de los tumores estudiados
2. Correlación entre tamaño y formación tubular tumoral
3. Correlación entre tamaño y grado nuclear tumoral
4. Correlación entre tamaño e Índice mitótico tumoral
5. Correlación entre tamaño y grado histológico tumoral
6. Correlación entre grado histológico y formación tubular tumoral
7. Correlación entre grado histológico y grado nuclear tumoral
8. Correlación entre grado histológico e índice mitótico tumoral
9. Correlación entre estatus ganglionar axilar y tamaño tumoral (1)
10. Correlación entre estatus ganglionar axilar y tamaño tumoral (2)
11. Correlación entre estatus ganglionar axilar y formación tubular tumoral (1)
12. Correlación entre estatus ganglionar axilar y formación tubular tumoral (2)

13. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado nuclear tumoral (1)
14. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado nuclear tumoral (2)
15. Correlación entre estatus ganglionar axilar e índice mitótico tumoral (1 )
16. Correlación entre estatus ganglionar axilar e índice mitótico tumoral (2)
17. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado histológico tumoral (1)
18. Correlación entre estatus ganglionar axilar y grado histológico tumoral (2)
19. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y tamaño tumoral
20. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y formación tubular tumoral.
21. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y grado nuclear tumoral
22. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos e índice mitótico tumoral
23. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y grado histológico tumoral
24. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y estatus ganglionar axilar (1)
25. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y estatus ganglionar axilar (2)
26. Correlación entre expresión de p53 y tamaño tumoral
27. Correlación entre expresión de p53 y formación tubular tumoral
28. Correlación entre expresión de p53 y grado nuclear tumoral
29. Correlación entre expresión de p53 e índice mitótico tumoral
30. Correlación entre expresión de p53 y grado histológico tumoral
31. Correlación entre expresión de p53 y estatus ganglionar axilar (1)
32. Correlación entre expresión de p53 y estatus ganglionar axilar (2)
33. Correlación entre expresión de c-erb2 y tamaño tumoral (1)
34. Correlación entre expresión de c-erb2 y tamaño tumoral (2)
35. Correlación entre expresión de c-erb2 y formación tubular tumoral (1)
36. Correlación entre expresión de c-erb2 y formación tubular tumoral (2)
37. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado nuclear tumoral (1)
38. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado nuclear tumoral (2)
39. Correlación entre expresión de c-erb2 e índice mitótico tumoral (1)
40. Correlación entre expresión de c-erb2 e índice mitótico tumoral (2)



41. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado histológico tumoral (1)
42. Correlación entre expresión de c-erb2 y grado histológico tumoral (2)
43. Correlación entre expresión de c-erb2 y estatus ganglionar axilar (1)
44. Correlación entre expresión de c-erb2 y estatus ganglionar axilar (2)
45. Correlación entre expresión de c-erb2 y estatus ganglionar axilar (3)
46. Correlación entre expresión de c-erb2 y estatus ganglionar axilar (4)
47. Correlación entre tamaño y densidad vascular tumoral (1)
48. Correlación entre tamaño y densidad vascular tumoral (2)
49. Correlación entre formación tubular y densidad vascular tumoral (1)
50. Correlación entre formación tubular y densidad vascular tumoral (2)
51. Correlación entre grado nuclear y densidad vascular tumoral (1)
52. Correlación entre grado nuclear y densidad vascular tumoral (2)
53. Correlación entre índice mitótico y densidad vascular tumoral (1)
54. Correlación entre índice mitótico y densidad vascular tumoral (2)
55. Correlación entre grado histológico y densidad vascular tumoral (1)
56. Correlación entre grado histológico y densidad vascular tumoral (2)
57. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral (1)
58. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral(2)
59. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral(3)
60. Correlación entre estatus ganglionar axilar y densidad vascular tumoral(4)
61. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y densidad vascular tumoral (1)
62. Correlación entre expresión de receptores estrogénicos y densidad vascular tumoral (2)
63. Correlación entre expresión de p53 y densidad vascular tumoral (1)
64. Correlación entre expresión de p53 y densidad vascular tumoral (2)
65. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral (1)
66. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral (2)
67. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral (3)
68. Correlación entre expresión de c-erb2 y densidad vascular tumoral (4)



## PRÓLOGO

El cáncer de mama femenino es un problema de salud pública de primer orden a nivel mundial, especialmente en los países de nivel económico-social alto-medio, debido a su frecuencia (20-25% de todos los cánceres femeninos), alta predisposición a padecerlo (5-10% con una expectativa de vida de 74 años) y a su alta mortalidad entre los 35 y 55 años (10%), prácticamente estable a pesar del refinamiento de las técnicas de diagnóstico precoz y a la investigación terapéutica (48).

Los países mediterráneos presentan menor incidencia de cáncer de mama (20-40 / 100.000 mujeres / año) que los países del norte de Europa (50-70 / 100.000 mujeres / año) (129). España muestra una tasa bruta de 49,12 / 100.000 mujeres / año, superior a la tasa estandarizada mundial de 36,26 / 100.000 mujeres / año. Es una causa importante de muerte prematura (3,5% de las causas de muerte femenina entre los 25 y 44 años) (112).

En la Comunidad Autónoma Andaluza es el cáncer más frecuente y la primera causa de mortalidad prematura en la mujer. Su incidencia tiende a crecer y en años sucesivos se incrementa el número de casos diagnosticados.

La distribución por provincias no es homogénea, mostrando el área metropolitana de Sevilla la mayor incidencia seguida del área territorial de la bahía de Cádiz (131,138).

El riesgo familiar ha quedado objetivado en las mutaciones de algunos genes, especialmente los genes BRCA-1 y BRCA-2 y confirmado el fenotipo de las pacientes de riesgo (amplio período reproductor, infertilidad o embarazos tardíos, ausencia de lactancia, obesidad, terapéutica hormonal, patología mamaria benigna de riesgo, etc.). El 95% de las mujeres tienen al menos un factor de riesgo.

La investigación sugiere que sólo algunas células tumorales adquieren capacidad invasora y metastásica por lo que su correcta identificación se ha convertido en un objetivo prioritario de la investigación oncológica y terapéutica. El papel de la angiogénesis en el proceso de crecimiento y metástasis del cáncer mamario parece demostrado, lo que ha desarrollado la investigación del papel terapéutico de drogas antiangiogénicas en fase preclínica (67,87,174).

# **INTRODUCCIÓN**

## **Concepto de angiogénesis**

El sistema vascular es el resultado de la combinación de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis supone la formación “de novo” de vasos sanguíneos a partir de la concentración de angioblastos de origen mesodérmico. La angiogénesis es un proceso complementario de la vasculogénesis en el que se forman neovasos a partir de los ya existentes mediante la proliferación y migración de sus células endoteliales. La angiogénesis regulada es un proceso fundamental en diferentes acontecimientos fisiológicos (desarrollo embrionario, transformación de la mucosa endometrial en el ciclo menstrual, curación de heridas, etc.). Es un proceso muy controlado mediante un delicado equilibrio entre estimuladores e inhibidores angiogénicos.

La angiogénesis no regulada es un factor decisivo en la evolución de determinadas situaciones patológicas (retinopatía diabética, psoriasis, etc.) y un requisito imprescindible para el crecimiento de las neoplasias (54,56,71). Asimismo, se ha considerado decisiva su intervención en el mecanismo de la invasión tumoral y de la diseminación metastásica de las células neoplásicas (67,157,165,80,71) y en el crecimiento de los depósitos metastáticos (170,80).

## **La angiogénesis tumoral**

Estudios experimentales de inducción tumoral han demostrado una secuencia progresiva de normalidad, hiperplasia y neoplasia epitelial (55). Mediante estudio inmunohistoquímico con antilaminina (un anticuerpo frente a un componente de la membrana basal vascular) se ha confirmado la adquisición de actividad angiogénica de la lesión en la fase hiperplásica, previa al estado neoplásico, manifestada por la alteración del patrón vascular de laminina y del incremento en la incorporación de timidina tritiada por las células endoteliales en

el tejido hiperplásico, claramente diferentes al observado en el tejido normal (89). Aunque no ha podido demostrarse la causa activadora de la angiogénesis (inhibida probablemente por el entorno), se ha invocado la superación de un tamaño crítico del tejido hiperplásico como causa más probable (55). Estos hechos sugieren que la inducción y activación de la angiogénesis se correlaciona con la transición de hiperplasia a neoplasia epitelial.

Este modelo experimental probablemente tenga una contrapartida importante en el cáncer humano ya que la mayoría de las neoplasias malignas humanas se originan en células epiteliales y son precedidas de lesiones preneoplásicas. La angiogénesis ha sido demostrada en estadios precoces, no invasivos, del cáncer mamario humano (46,79,185).

Aunque la relación entre el proceso angiogénico y la progresión tumoral ha sido investigada en diferentes tumores humanos (próstata, pulmón, cerebro, hueso, etc.), la mayor parte de esta investigación se ha centrado en el cáncer mamario.

El desarrollo de los métodos inmunohistoquímicos ha permitido identificar una amplia serie de factores estimuladores e inhibidores de la angiogénesis. Estos factores actúan como factores autocrinos o paracrinos y ponen en marcha el mecanismo angiogénico al romperse el equilibrio entre factores inductores y supresores mediante el incremento de los primeros o la disminución de los segundos (127).

### *Factores estimuladores de la angiogénesis*

El **factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF)** es un promotor importante de la angiogénesis (88,109) y el más relacionado con el crecimiento tumoral y por ello el de mayor valor pronóstico (8,66). Es una citoquina potente que regula la proliferación y permeabilidad vascular y actúa como un factor antiapoptótico en los neovasos. Su sobreexpresión está relacionada con las mutaciones del oncogen supresor p53 (109). Influye además en la expresión de las metaloproteinasas y en la supervivencia y adquisición del potencial invasor por las células tumorales (128,75). Se han identificado 5 isoformas de diferente peso molecular y capacidad de adherirse a la superficie celular. La isoforma 189 está muy relacionada con el pronóstico de tumores sólidos. Sus efectos mitógenos y quimiotácticos están mediatizados por dos receptores exclusivos

del endotelio vascular. Su expresión está estimulada de forma importante por la hipoxia en el tejido tumoral, que refuerza su acción antiapoptótica (70,146), por diversos factores de transcripción, y otras citoquinas.

La **interleucina 8 (IL-8)** es un factor proangiogénico potente secretado por las células tumorales y por las células estromales e inflamatorias del entorno tumoral (17). Inicialmente identificada como factor quimiotáctico de los neutrófilos, se le han reconocido posteriormente funciones que estimulan el crecimiento tumoral y la producción de metástasis (15). Su expresión parece relacionada con las líneas celulares de cáncer de mama que no expresan receptores estrogénicos (62,108) pero otros autores niegan esta relación (107,108). La alta expresión de IL-8 está asociada a un potencial invasor alto de las células neoplásicas y experimentalmente, a mayor potencial metastático (62). Aunque no existe una interregulación entre el VEGF y la IL-8, sí se observa una sobreexpresión paralela de ambas citoquinas, lo que sugiere que sus vías de regulación son comunes (27).

Los **factores de crecimiento fibroblástico ácidos y básicos, factor alfa de necrosis tumoral, factor transformador del crecimiento alfa, factor de crecimiento endotelial plaquetario, factor de permeabilidad vascular, factor transformante del crecimiento beta, angiotropina, angiogenina** y otros factores secretados por el tumor, por las células endoteliales (**endotelinas**) y por las células del tejido conectivo estimulan también el proceso de angiogénesis (3, 93, 139,178). La mayor parte de estos factores tienen efecto mitógeno y quimiotáctico sobre las células endoteliales. La angiotropina y el factor de necrosis tumoral alfa tienen sólo efecto quimiotáctico y el efecto de la angiogenina sobre el endotelio es desconocida. Los macrófagos y linfocitos activados participan asimismo en la ampliación del efecto angiogénico. La heparina secretada por los mastocitos, muy numerosos en la fase preangiogénica de algunos tumores, actúa sobre la matriz extracelular favoreciendo la angiogénesis.

### *Factores inhibidores de la angiogénesis*

Los factores inhibidores de la angiogénesis más importantes son la **angiostatina, endostatina, trombospodina y los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas**. Estos factores han sido demostrados en tumores “durmientes” y parecen que impiden su adquisición del fenotipo angiogénico (88). La angiostatina es un dominio críptico del plasminógeno y se ha demostrado experimentalmente su origen en la metaloproteinasa 2 producida por el tumor de Lewis pulmonar. La endostatina es un fragmento proteolítico c-terminal del colágeno XVIII que se une directamente a uno de los receptores del VEGF bloqueando la fosforilación de la tirosina en el receptor endotelial inducida por el VEGF. Este bloqueo del receptor impide a su vez la actuación de otros factores, con lo que se bloquea la proliferación celular. Asimismo inhibe la producción de las proteínas antiapoptóticas bcl-2 y bclx e incrementa la apoptosis de las células endoteliales selectivamente. La producción de trombospodina está controlada por la proteína p53 que al inactivarse durante la carcinogénesis inhibe su producción y acelera el crecimiento tumoral y la angiogénesis de forma paralela (109,177).

### *Factores que actúan indirectamente en la angiogénesis*

Otros factores participan indirectamente en la angiogénesis degradando la membrana basal y la matriz extracelular, un proceso necesario para la iniciación de aquella (10). Los más importantes son las catepsinas y las metaloproteinasas de la matriz extracelular.

Las **catepsinas** son proteasas lisosómicas ampliamente distribuidas en los tejidos normales e implicadas en variados procesos fisiológicos. Son sintetizadas como proenzimas y posteriormente glicosiladas y fosforiladas a enzima activo. La estimulación de algunos factores oncogénicos como las queratocinas alteran su transporte a los lisosomas y activan su acción citosólica o en la matriz extracelular, comprobándose altos niveles de catepsinas en relación con destrucción patológica de la matriz extracelular en el proceso de invasión tumoral e inicio de las metástasis (18). En las líneas celulares del cáncer de mama metastático se han demostrado altas tasas de catepsina D y en el hueso metastático sobreexpresión de catepsina L. La catepsina G es

elaborada por los neutrófilos y altera la barrera endotelial y la matriz extracelular, facilitando su llegada al foco inflamatorio. Todos estos hechos sugieren un importante papel, ya sea directo, eliminando barreras o indirecto por procesamiento de otras proteasas latentes en la matriz, o degradando sus inhibidores proteicos, íntimamente relacionado con algunas etapas del proceso angiogénico.

Las **metaloproteinasas de la matriz** son endopeptidasas metalo-Zn secretadas por células normales y tumorales que actúan en la renovación de la matriz extracelular. Su sobreexpresión está directamente relacionada con la estimulación de la angiogénesis en relación con el proceso de crecimiento, invasión y metástasis tumoral (127) y posiblemente facilite la liberación de factores angiogénicos secuestrados (23).

**El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)** es una proteína rica en cisteína que promueve la adhesión, proliferación y migración de células endoteliales vasculares bajo condiciones de hipoxia, tanto in vitro como in vivo (96,144, 145).

La mayor parte de los tumores epiteliales mantiene durante años una actitud no angiogénica, probablemente por la secreción en las células tumorales de los factores antiangiogénicos considerados anteriormente. Ello motiva que el crecimiento tumoral no exceda los 2 o 3 mm de diámetro (67). Sin embargo en esta fase antiangiogénica las células neoplásicas mantienen un ritmo proliferativo semejante al de cualquier tumor de crecimiento rápido que es neutralizado por apoptosis (84,127). La adquisición del fenotipo angiogénico por el tumor determina la disminución de la apoptosis y el predominio de la proliferación celular lo cual estimula su rápido crecimiento (55). Este crecimiento rápido parece determinar hipoxia en determinadas áreas tumorales lo que estimula la liberación de factores de crecimiento endotelial que provocan modificaciones morfológicas en las células endoteliales, quizás un primer paso para su migración (25) y factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) que provoca una respuesta angiogénica llamativa, con adhesión a la matriz de células endoteliales, proliferación y migración de las mismas (89, 96,144,145). Los neovasos muestran características morfológicas que facilitan la permeabilidad celular y paralelamente dificultan una oxigenación efectiva de las



células tumorales (71), lo que por una parte facilitaría los mecanismos invasores y metastásicos y por otra contribuiría a la hipoxia y posterior liberación de factores angiogénicos por el tumor.

En la adquisición del fenotipo angiogénico parece ser decisiva la expresión selectiva del receptor de adhesión de la integrina alfa-v B3. La unión de esta integrina al receptor produce una señal específica que activa la supervivencia de las células endoteliales angiogénicas, acompañada de una disminución de p53 y p21 y del incremento de bcl2 (155,156).

La angiogénesis es un proceso proliferativo activo que es independiente de la proliferación de células endoteliales y de las células tumorales, por lo que hay que suponer que estos procesos están regulados por mecanismos independientes (36,59,170,118).

La expresión angiogénica intratumoral es muy heterogénea y no relacionada con la diferenciación histológica del tumor (9). Recientes estudios han demostrado que las áreas con mayor densidad microvascular (puntos calientes-hot spot) no corresponden al borde de crecimiento tumoral (178) sino a las zonas centrales del tumor (9).

La clonación de células tumorales demuestra que no todas las células neoplásicas son angiogénicas y las que lo son no expresan el mismo nivel de factores angiogénicos ni el mismo número de ellos (178,180). Estas mismas características incumben a las células con capacidad metastásica por lo que su capacidad de sobrevivir en el órgano diana también es variable. Asimismo no se ha podido establecer una correlación directa entre niveles de un factor tumoral proangiogénico demostrado (VEGF) e incremento de la neovascularización tumoral (24,72,130).

Tampoco ha podido demostrarse una correlación topográfica entre expresión de VEGF y densidad microvascular (111,130). Todos estos hechos demuestran la complejidad del proceso angiogénico que si bien está estimulado de manera importante por VEGF, lo es de forma indirecta a través de la activación de células endoteliales y de factores señalizadores en el tejido conectivo en diferentes etapas del proceso de angiogénesis (96,144,145,162).

En síntesis la angiogénesis inducida por tumores supone pues, una secuencia de etapas imbricadas entre sí, estimuladas por mecanismos múltiples en los que intervienen factores de acción demostrada que se interrelacionan por vías

no bien establecidas. El inicio del fenómeno angiogénico está reflejado en una serie de hechos contratados y que de forma esquemática exponemos :

1. Liberación de proteasas por las células endoteliales activadas.
2. Degradación de la membrana basal vascular preexistente.
3. Migración de células endoteliales intratumorales.
4. Proliferación de las células endoteliales.
5. Canalización y ramificación de los neovasos.
6. Formación de nueva membrana basal y adherencia de los pericitos (estabilización del neovaso).
7. Fusión de los vasos neoformados.
8. Establecimiento del flujo sanguíneo en los neovasos.

Estudios recientes añaden una nueva etapa en el proceso angiogénico: la maduración vascular. Este proceso se ha estudiado en el cáncer de mama inmunohistoquímicamente mediante un anticuerpo monoclonal (LH39) que reconoce un epitopo de la lámina lúcida de vénulas y capilares maduros, no existente en los vasos neoformados inmaduros. El grado de expresión de este anticuerpo no se correlaciona con la angiogénesis cuantitativa ni con la mayoría de los factores pronósticos comúnmente utilizados en el cáncer mamario, pero es significativamente alto en el tejido mamario normal comparándolo con el tejido tumoral e inversamente relacionado con el estatus ganglionar, por lo que es un factor predictor de metástasis ganglionar en el cáncer de mama (91).

El proceso metastático es un fenómeno que comparte propiedades fisiológicas y moleculares con la angiogénesis y necesita de su colaboración. Ambos son procesos invasores en los que las células (endoteliales en la angiogénesis y tumorales en la metástasis), atraviesan barreras biológicas (membrana basal, matriz extracelular y estroma con células y macromoléculas) para alcanzar su tejido diana. A semejanza de la angiogénesis, la metástasis es un proceso en etapas que sintetizamos a continuación:

1. Salida de las células neoplásicas del tumor primario
2. Superación de la membrana basal epitelial y del estroma

3. Penetración en el sistema vascular y circulación por el torrente sanguíneo
4. Salida del torrente sanguíneo atravesando la membrana basal endotelial y el estroma perivascular.
5. Penetración en el tejido diana
6. Angiogénesis, proliferación celular y crecimiento tumoral.

La teoría clonal de las metástasis (92) podría explicar la diferente virulencia del proceso invasor y metastático de tumores con histología similar que dependería del número de clones de células tumorales con fenotipo angiogénico y del grado de expresión de factores proangiogénicos en esas células tumorales (54,55, 177,178).

## **Factores pronósticos en el Cáncer de mama**

### *1.- Factores clínicos*

Aunque tradicionalmente se ha atribuido un peor pronóstico a las pacientes jóvenes con cáncer de mama, no existe una relación comprobada entre **edad** y supervivencia. En las grandes series parece existir mayor índice de afectación ganglionar axilar en las pacientes con edad inferior a los 35 años (120).

El **embarazo** ha sido asimismo considerado como un factor agravante del cáncer mamario. Sin embargo no existen evidencias de que sea un factor pronóstico independiente (7).

Aunque es un método válido en cuanto a la detección de cáncer mamario y de metástasis axilares, la palpación clínica es un método grosero en la apreciación de tamaño y afectación o no de ganglios axilares. El tamaño macroscópico apreciado sobre la pieza quirúrgica en tumores grandes y el tamaño microscópico medido sobre el corte histológico son los métodos recomendados para la valoración de este factor pronóstico, por lo que los consideraremos en el apartado de factores morfológicos. Actualmente la mamografía ha superado a la exploración clínica en cuanto a la detección de tumores de reducido tamaño por lo que aproximadamente el 50% de las pacientes diagnosticadas de cáncer

mamario presentan tumores pequeños sin metástasis axilares. En este amplio grupo de pacientes la información predictiva adicional puede resultar de gran valor. Como veremos más adelante, la combinación de estos factores con otros de tipo morfológico, permiten obtener un valor predictivo fiable (78,158).

## *2.- Estadío tumoral*

El screening mamográfico ha incrementado el diagnóstico de **carcinoma intraductal** en un 13,6% en la población general, lo que ha reducido su mortalidad un 1,5% (48). El 85% de los casos se diagnostica por mamografía y el 15% restante por hallazgo quirúrgico casual o más raramente por signos clínicos. El carcinoma intraductal supone el 10-30% de los carcinomas mamarios diagnosticados por mamografía, el 17% carecen de microcalcificaciones y el 80% son de menor tamaño al sugerido en el diagnóstico por imagen (85).

El carcinoma intraductal es una lesión precursora (obligada o no obligada) con un riesgo relativo de desarrollar un carcinoma infiltrante de 8-11, pero no una enfermedad necesariamente mortal. La evolución fatal parece debida a focos de carcinoma invasor no detectados o a carcinomas invasores de novo postoperatorios (43).

El **carcinoma microinvasivo** supone menos del 1% de todos los carcinomas mamarios y va asociado generalmente al carcinoma intraductal. Los criterios diagnósticos son muy heterogéneos (43). Las metástasis axilares son excepcionales por lo que su tratamiento es superponible al del carcinoma intraductal.

El **carcinoma invasivo** supone la mayor parte de los carcinomas de mama. El aumento de tamaño tumoral, la afectación ganglionar y las metástasis a distancia, se relacionan directamente con un agravamiento progresivo del pronóstico. En los casos frecuentes en los que existe un componente tumoral intraductal, el pronóstico queda definido por la extensión del componente invasor (53,141).

### *3.- Factores morfológicos*

En 1925, GREENOUCH inicia la clasificación pronóstica de los tumores malignos mamarios utilizando criterios morfológicos. Desde entonces el análisis histopatológico ha sido de gran utilidad en el reconocimiento de las características morfológicas de los tumores mamarios malignos permitiendo clasificarlos en tipos histológicos que han definido su excelente o mal pronóstico.

#### *a. Tipos histológicos*

Algunos carcinomas de mama invasores presentan características histológicas específicas que permiten subclasificarlos y asociarlos generalmente a un buen pronóstico. Estos “tipos especiales” (150) representan entre el 25 y el 30% de todos los carcinomas invasores mamarios y deben diagnosticarse microscópicamente como tales cuando las características histológicas específicas están presentes al menos en el 75% del tumor (43). No obstante el valor predictivo es mucho más fiable cuando dichas características morfológicas están presentes en el 90% o en la totalidad del tumor, incluso en situaciones clínicas desfavorables (tumor de gran tamaño). El amplio grupo restante de carcinomas mamarios invasores se nominan como “sin otras especificaciones” (51) o “no de tipo especial “ (150).

El **carcinoma ductal invasor sin otras especificaciones**, constituye el tipo histológico más frecuente de tumores mamarios (43,44). Algunos grupos de trabajo mantienen el término carcinoma ductal infiltrante (137), perpetuando el concepto tradicional, sin pruebas concluyentes, de que estos tumores se originan en el epitelio ductal a diferencia de los carcinomas lobulillares que se originarían en el lobulillo mamario. La tendencia actual es la de considerar la unidad terminal ducto-lobulillar como el origen común de la mayoría de los carcinomas mamarios (11). La mayor parte de los carcinomas de mama de tipo familiar, asociados a mutaciones de BRCA 1 y BRCA 2 son de este tipo con peculiaridades histológicas (bordes expansivos, alto índice mitótico y notable

infiltrado inflamatorio en los BRCA 1 y bordes expansivos con bajo índice mitótico en los BRCA 2) (100). Macroscópicamente pueden ser estrellados o nodulares y suelen ser firmes, crujen al corte y su aspecto es grisáceo con estrías amarillentas. Microscópicamente, las células neoplásicas pueden distribuirse en grupos, trabéculas o cordones con tendencia al patrón sólido o sincitial con variables formación de túbulos, atíпия nuclear y actividad mitótica. El estroma es muy variable. Suele asociarse a un componente intraductal de variable extensión con o sin comedonecrosis. Cuando más del 50% de las células neoplásicas son bizarras, gigantes, fusiformes o con diferenciación escamosa se denominan pleomórficos y se asocian a un pronóstico ominoso (148). Raramente se observan células gigantes multinucleadas de tipo histiocitario asociadas a un carcinoma ductal infiltrante convencional, sin repercusión pronóstica y mucho más excepcional es la presencia de áreas de coriocarcinoma (43).

El tipo histológico especial más importante es el **carcinoma tubular** y sus variantes. La característica morfológica que lo identifica son los túbulos de contornos angulados, revestidos por células con núcleos regulares, pequeños y de cromatina fina que deben estar presentes al menos en el 90% del tumor. El 10% restante puede corresponder a un carcinoma sin otras especificaciones siempre que el grado citológico de sus células sea bajo. Representan el 2% de todos los carcinomas mamarios invasores y hasta el 7% en las series de tumores menores de 1 cm. Las metástasis son infrecuentes y no empeoran el pronóstico (39). Las alteraciones genéticas son escasas y afectan a locus distintos a los habitualmente alterados en el cáncer mamario usual, lo que sugiere que es un tipo genéticamente distinto (43).

**El carcinoma cribiforme** supone entre el 0,8 y 3,5% de los carcinomas mamarios y se caracteriza histológicamente por la presencia de nidos tumorales constituidos por estructuras tubulares adosadas, sin estroma interpuesto y revestidas por células de bajo grado citológico (44). Incluso en casos con afectación ganglionar axilar (14%), no se afecta adversamente la supervivencia de las pacientes a los 10 años (90-100%) (43).

El **carcinoma mucinoso o coloide** muestra característicamente lagos extracelulares de mucina en los que flotan agregados de células neoplásicas con grado citológico bajo, en al menos el 90% del tumor (53). Representan el 2% de todos los carcinomas mamarios y la mayor parte son puros, con excelente pronóstico y baja probabilidad de metástasis (3-15%) (39). Cuando existen áreas de carcinoma invasor no especial, las metástasis aumentan a un 33-46% y la supervivencia disminuye considerablemente.

El **carcinoma adenoide quístico** representa el 0,1% de los carcinomas mamarios. Muestra una histología similar al de las glándulas salivares y tiene bajo potencial agresivo, siendo las metástasis axilares excepcionales (43).

El **carcinoma secretor** es un tumor con arquitectura sólida, tubular y microquística cuyas células secretan material lácteo. Más del 30% de las pacientes son menores de 20 años y el 60%, menores de 30 años; de ahí el sinónimo de carcinoma juvenil.

El pronóstico es favorable en niñas y adolescentes y algo peor en adultos, pero el riesgo de metástasis es similar (15%) (43).

El carcinoma **lobulillar infiltrante** es un tumor con dificultad diagnóstica por criterios morfológicos puros. Ello determina su gran variabilidad en la incidencia (1-20%) y desigual pronóstico en las grandes series. Las características histológicas que definen este tipo histológico son: un modo característico de infiltración (hileras o "filas indias"), células regulares, pequeñas y de bajo grado nuclear y baja densidad celular (44, 53, 137).

Frecuentemente sobreexpresa la proteína ciclina D1 (122). Sus variantes alveolar y sólida muestran el mismo tipo de células pero carecen del patrón infiltrativo. Por el contrario, la variante pleomórfica exhibe un patrón infiltrativo característico y células con alto grado nuclear y actividad mitótica (43). Se ha demostrado un excelente pronóstico en el carcinoma lobulillar infiltrante clásico en comparación con sus variantes, especialmente con la pleomórfica, cuya baja supervivencia y alta tasa de recurrencias la definen como un tumor de mal pronóstico (50).

Un tipo especial de carcinoma mamario invasor es el **carcinoma medular**, el cual a pesar de tener características histológicas muy definidas (53), es frecuentemente sobrediagnosticado y presenta alta discordancia interobservadores (135), por lo que su valor pronóstico está aún por definir.

La rentabilidad pronóstica de esta metodología es pues limitada, aunque útil, ya que los tipos histológicos especiales del cáncer mamario invasor con buen pronóstico suponen un porcentaje bajo de casos que en conjunto no superan el 30%.

**El carcinoma micropapilar** supone menos del 2% de los carcinomas mamarios y aunque suele presentar invasión vascular y metástasis ganglionar en el diagnóstico, estos factores desfavorables no parecen influir en la supervivencia (43).

Se han descrito además de los considerados anteriormente, varios tipos de carcinomas mamarios con peculiaridades histológicas (oncocítico, apocrino, neuroendocrino, acinar, rico en glucógeno, rico en lípidos, etc.) cuyo pronóstico, o no está bien establecido debido al escaso número de casos, o es similar al del carcinoma ductal NOS.

La rentabilidad pronóstica de esta metodología es pues limitada, aunque útil, ya que los tipos histológicos especiales del cáncer mamario invasor con buen pronóstico suponen un porcentaje bajo de casos que en conjunto no superan el 30%.

#### *b. Grado histológico combinado*

Es el resultado final de los intentos de mejorar la clasificación pronóstica iniciada por GREENOUGH en 1925 durante varias décadas (19,20,26,45,51,77,181). Algunos autores han apoyado la clasificación pronóstica de los carcinomas mamarios en criterios morfológicos exclusivamente nucleares (19,77,51) que no ha aportado resultados completamente satisfactorios. En 1973 se planifica el Nottingham / Tenovus Primary Breast Cancer Study a fin de establecer de una manera estandarizada, el potencial pronóstico de una serie de características morfológicas en el cáncer de mama, utilizando un protocolo de fijación y muestreo de la pieza quirúrgica de tumorectomía o de mastectomía con



dissección ganglionar axilar y seguimiento clínico a largo plazo, de un número importante de pacientes con carcinoma de mama operable.

El resultado de este estudio se concreta en el grado histológico combinado, basado en la valoración semicuantitativa de tres parámetros histológicos: diferenciación tubular del tumor, morfología nuclear y conteo de mitosis (45). Cuando se analizan cada uno de estos parámetros por separado se obtiene un valor predictivo diferente, observándose que el mejor indicador de buen pronóstico es la formación de túbulos bien definidos, mientras que un alto conteo de mitosis ha sido el mejor indicador de una mala evolución (124). El índice mitótico (número de mitosis contadas en 10 campos microscópicos de gran aumento) es el mejor predictor de supervivencia en pacientes con cáncer de mama y ganglios axilares metastásicos y libres de tumor (12,13,167,168). Su alta reproducibilidad está fundamentada en el seguimiento de estrictos criterios para reconocer las mitosis y las áreas en las que el tumor debe ser estudiado (45). El cuidadoso recuento de mitosis en relación a un porcentaje establecido de células tumorales muestra una estrecha correlación con la proliferación celular (149,179).

El grado histológico combinado, adecuadamente protocolizado, refuerza el consenso inter e intraobservadores y minimiza la discrepancia en parámetros aislados, sin alterar el grado histológico final, lo que incrementa su utilidad clínica (33). En contraste con otros sistemas de categorización que incluyen casi dos tercios de los casos como carcinomas escasamente diferenciados, este sistema discrimina los casos en grupos más homogéneos (150). Los carcinomas mamarios poco diferenciados presentan altas tasas de metástasis axilares y baja supervivencia, independientemente del estatus ganglionar y del tamaño tumoral (53,114).

Varios autores sostienen que el grado histológico combinado no debe excluir la tipificación histológica, extremadamente útil para separar los casos de excelente pronóstico (26,123,124).

Actualmente, la mamografía detecta carcinomas mamarios de muy pequeño tamaño, por lo que el grado histológico combinado proporciona una información predictiva muy valiosa que añade un beneficio adicional al diagnóstico precoz del tumor sin comprometer el espécimen con vistas a otras pruebas pronósticas.

Complementando el grado histológico combinado con el tamaño tumoral (medido en la pieza quirúrgica) y estatus ganglionar se obtiene el índice pronóstico de Nottingham (NPI), altamente reproducible y de comprobado valor predictivo en cuanto a la supervivencia y tasas de recurrencia (78,158). Este índice mejora el valor predictivo del grado histológico combinado. Sin embargo algunos autores encuentran tasas de supervivencia similares en el grupo de pacientes con ganglios metastáticos y en el que no están afectados (12). La combinación del índice de actividad mitótica, tamaño tumoral y estatus ganglionar configura el índice morfométrico pronóstico (IMP), cuya relación inversa con la supervivencia ha quedado demostrada (167).

### *c. Tamaño tumoral y estatus ganglionar*

El tamaño tumoral y el estatus de los ganglios axilares son factores pronósticos estrechamente correlacionados e independientes (12,105,141). La discrepancia entre la medida macroscópica y la obtenida sobre el componente invasor en el corte histológico suele ser frecuente por lo que la medición microscópica es de mayor fiabilidad pronóstica (28,53). Las pacientes con tumores de tamaño inferior a 2 cm tienen supervivencias a los 5 años del 75-90%, mientras que con tumores superiores a los 5 cm esta tasa baja a los 44-70%. Estos resultados son similares independientemente de que los ganglios estén afectados o no (1). Las pacientes con tumores de 1 cm o menos tienen tasas de supervivencia e intervalo libre de enfermedad similares a las encontradas en los tipos histológicos especiales de buen pronóstico (137,141).

La supervivencia a los 5 años de pacientes sin metástasis axilar histológica es del 67-85%. Esta tasa declina progresivamente con el número de ganglios afectados (53), aproximándose al 30% cuando están metastatizados 10 ganglios axilares (175). Por ello aproximadamente el 25-30% de las pacientes que presentan carcinoma limitado a la mama pueden sucumbir por la enfermedad en comparación del 50-75% de las que padecen además metástasis en los ganglios axilares (9). Las micrometástasis (focos tumorales < 2 mm.) están presentes en el 9-13% de los ganglios axilares inicialmente considerados como negativos (53). Los falsos negativos aumentan hasta un 20% cuando se utiliza inmunohistoquímica (5).

No existe consenso sobre la influencia de las micrometástasis sobre el pronóstico (30,37).

El estudio histológico del ganglio centinela axilar es un predictor sensible y específico del estatus ganglionar axilar (4). Sin embargo la tasa de falsos negativos alcanza el 25% en estudio intraoperatorio y hasta el 28,6% con métodos rutinarios (53). La inmunohistoquímica demuestra micrometástasis en el 10-20% de los ganglios centinelas, inicialmente considerados negativos con las técnicas de rutina (5). No obstante, este hecho influencia negativamente el pronóstico de forma poco significativa (106).

#### *d. Invasión linfática, vascular y perineural*

La invasión linfática es un factor predictivo importante e independiente de metástasis en pacientes sin afectación ganglionar (28,35). La reproducibilidad interobservadores de este hallazgo es baja (68) debido a la confusión del vaso linfático con artefactos de retracción de la técnica histológica y la difícil identificación del mismo con técnicas histológicas de rutina (43).

La incidencia de invasión vascular oscila entre el 5 y el 50% por lo que a pesar de ser considerado como un factor de mal pronóstico, no ha podido ser evaluado objetivamente (43).

#### *e. Necrosis e infiltrados inflamatorios intratumorales y estroma tumoral*

La necrosis intratumoral es un factor de mal pronóstico (68). La influencia pronóstica de los infiltrados inflamatorios intratumorales y de las características estromales es controvertida (43,154).

#### *f. Extensión del componente tumoral intraductal*

Es un factor pronóstico de recurrencia local cuando se desconoce la afectación o no de los márgenes de resección (43). Su valor predictivo en cuanto al riesgo de metástasis y supervivencia no está claramente establecido (53).

#### 4. *Factores con expresión inmunohistoquímica*

El desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas ha permitido poner de manifiesto determinados factores que han podido ser cuantificados por métodos morfológicos, ya que se expresan sobre el corte histológico, en el que se mantiene la arquitectura y las características morfológicas de la lesión.

La determinación de **receptores hormonales (estrógenos y progesterona)** en las células tumorales mamarias es un método valorativo del grado de diferenciación tumoral (52,83,117) pero su valor pronóstico no ha sido satisfactorio. En pacientes con ganglios axilares no afectados por el tumor y expresión de estos receptores, el grado de recurrencia es solamente un 8-10% menor que en los pacientes que no los expresan (117) y el intervalo libre de enfermedad a largo plazo es similar en ambos grupos (83). Otros sostienen que la expresión de receptores estrogénicos se relaciona con la supervivencia pero no con el intervalo libre de enfermedad (6). No obstante la determinación de estos receptores es útil desde el punto de vista terapéutico ya que las pacientes que los expresan responden mejor al tratamiento con Tamoxifeno u otras formas de modulación hormonal que las que no los expresan (6,76,159). La positividad se expresa por el porcentaje de células tumorales con tinción nuclear combinado con la intensidad de la tinción (102), existiendo una relación directa entre el porcentaje de positividad, grado histológico y respuesta terapéutica. Los receptores de progesterona son expresados por el 55-65% de los carcinomas mamarios y por 2/3 de los que muestran receptores estrogénicos positivos (6).

Solamente un 5% de los carcinomas mamarios expresan receptores de progesterona positivos y receptores de estrógenos negativos. Algunos atribuyen a los receptores de progesterona mejor valor pronóstico sobre el intervalo libre de enfermedad que los receptores estrogénicos (101).

La expresión del **factor de proliferación celular (Ki 67)**, tiene valor predictivo independiente cuando está presente en altos niveles (143). Es un antígeno nuclear que está presente en todas las fases del ciclo celular excepto en la G0 y fase inicial de la G1 y su expresión se correlaciona con otros indicadores de la

proliferación celular ( timidina marcada, fracción de la fase S y contaje mitótico). Su expresión es muy heterogénea (32).

La sobreexpresión y / o amplificación del **protooncogen HER-2**, situado en el brazo largo del cromosoma 17 e implicado en la regulación de receptores de factores de crecimiento, se manifiesta inmunohistoquímicamente por la sobreexpresión de la proteína **c-erb2 (neu)**. El método inmunohistoquímico es muy específico cuando es negativo (tinción de membrana negativa, positiva en menos del 10% de las células tumorales o positiva débil o parcial en más del 10% de las células neoplásicas) o fuertemente positivo (tinción de membrana intensa y completa en más del 10% de las células tumorales). En este último caso tiene valor predictivo, relacionándose con alto grado histológico, baja supervivencia y mala respuesta al tratamiento hormonal y quimioterápico convencional (5,160). Asimismo, la sobreexpresión de c-erb2 posibilita el bloqueo del dominio extracelular del receptor de membrana con ciertas drogas de nuevo diseño (Transtuzumab) con buen efecto terapéutico en pacientes con metástasis (176). Los casos con positividad intermedia (tinción de membrana completa, de leve o moderada intensidad) se correlacionan mal con los resultados terapéuticos por lo que es preferible valorarlos mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) (134). Ni la amplificación (nº incrementado de copias del gen) ni la sobreexpresión de c-erb2 indican la activación de la proteína que es la forma funcionalmente activa del receptor. Por ello los anticuerpos utilizados no discriminan entre formas activas e inactivas de erb-2 (53). El estudio simultáneo de la expresión de c-erb2 y los parámetros que constituyen el grado histológico combinado revela una relación directa entre el número de copias del gen y el grado histológico final, pero pierde su valor pronóstico en el análisis de regresión, siendo absorbido por el grado histológico (163).

La sobreexpresión de **p53** se produce en el 25% de los carcinomas mamarios debido a la mutación del gen supresor TP53, lo que induce un acúmulo de proteína inactiva y estable en las células neoplásicas (47). Sin embargo, en el 20% de los casos la mutación no produce una proteína estable y por ello no es detectada por inmunohistoquímica. Aunque se ha asociado la alteración de p53 con un pronóstico malo, no hay consenso sobre el significado de su

sobreexpresión inmunohistoquímica en cuanto a la supervivencia, establecida por otros métodos (secuenciación del DNA) (53).

La participación de p53 en procesos tan importantes como el control del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis, sugieren que mutaciones puntuales en determinadas localizaciones del gen están más relacionadas con un pronóstico adverso que otras (98,182,184). Se ha demostrado la relación de p53 con BRCA1 en el cáncer de mama hereditario (151) y mutaciones de p53 en las líneas germinales de pacientes con Síndrome de Li-Fraumeni, un síndrome con alta incidencia de cáncer mamario (43). Su valoración se establece en términos de positividad o negatividad.

La sobreexpresión del **receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)** se asocia a la ausencia de receptores estrogénicos y escasa respuesta al Tamoxifeno, pero su relación con la supervivencia no está establecida (53).

El **bcl2** es un marcador de buen pronóstico, asociado a la expresión de receptores estrogénicos y a una buena respuesta al Tamoxifeno, (175). Su expresión no tiene valor predictivo sobre la supervivencia en pacientes con ganglios axilares negativos, pero su negatividad en pacientes con ganglios axilares afectados empeora el pronóstico (82).

**pS2** es una proteína citoplasmática que se expresa únicamente después de la estimulación estrogénica y que actúa como un factor de crecimiento. Además de ser predictor en la respuesta al tratamiento hormonal, su expresión está relacionada con mejor pronóstico (43).

La sobreexpresión de **catepsina D** se ha relacionado con características clínico– patológicas de mal pronóstico, pero su valor como factor pronóstico independiente en pacientes sin afectación ganglionar axilar es controvertido (53).

La proteína **ciclina D1** aparece sobreexpresada en el 80% de los carcinomas lobulillares pero no siempre se acompaña de amplificación del gen (122).

## 5. *Angiogénesis*

Ha sido demostrado experimentalmente que el crecimiento tumoral in vitro e in vivo es dependiente de la angiogénesis (54,55). En bastantes tumores malignos están establecidas dos fases bien definidas: la fase prevascular, de años de duración, está relacionada con crecimiento tumoral y potencial metastático limitados. La fase vascular, iniciada con la angiogénesis, queda determinada por un crecimiento tumoral rápido no acompañado necesariamente de un potencial metastático elevado. Sin embargo, la puesta en marcha del mecanismo invasor y metastático necesita imprescindiblemente de la angiogénesis (8,71,88,170,177,178).

La ausencia de células neoplásicas sanguíneas es la norma si no se ha producido angiogénesis previa. El aumento de vasos neoformados favorece la incorporación de células neoplásicas al torrente sanguíneo gracias al aumento de la masa tumoral y a las características fenestradas de los mismos (71), por lo que el éxito de la metástasis depende, al menos en parte, del número absoluto de células neoplásicas circulantes (60,110). También es importante la capacidad angiogénica de las células tumorales circulantes en el proceso metastático. Esta característica está distribuida de forma heterogénea en la masa tumoral por lo que un clon de células tumorales con una alta tasa de células angiogénicas, probablemente tenga mayor éxito metastático en el órgano diana que un clon con una tasa baja de células con esta propiedad. Igual que ocurre en el tumor primario, la angiogénesis es un proceso imprescindible para estimular el crecimiento del depósito metastático en el órgano diana y su posterior proceso de diseminación (178).

La valoración cuantitativa de la angiogénesis como factor predictivo de metástasis se utilizó por primera vez en el melanoma cutáneo (153) y posteriormente en otros órganos (61,142). La técnica inmunohistoquímica ha facilitado la cuantificación vascular mediante la utilización de marcadores vasculares específicos e incluso ha permitido discriminar los vasos preexistentes de los neoformados (91). Utilizando esta técnica se han determinado con facilidad las áreas tumorales con mayor densidad de vasos neoformados

(puntos calientes) (99,178). Numerosas evidencias sostienen que el carcinoma mamario es un tumor dependiente de la angiogénesis (41,55,65,71,132,170). La expresión de angiogénesis es precoz en el cáncer mamario y detectable en el estadio intraductal (79,140,185). La resonancia magnética con contraste encuentra una relación evidente entre incremento de densidad vascular y aparición de cáncer mamario (49). Este aumento de densidad vascular se comprueba histológicamente alrededor de los conductos mamarios con carcinoma intraductal en relación a la existente alrededor de los conductos normales (185). Asimismo se advierte mayor densidad angiogénica alrededor de ductos con carcinoma intraductal de tipo comedocarcinoma, un fenotipo de mayor agresividad biológica que alrededor de conductos mamarios con carcinoma intraductal habitual (185) y en los márgenes infiltrativos del carcinoma mamario (16,57,59,177,178). Se ha demostrado que el aumento de la densidad microvascular es un indicador pronóstico significativo independiente del estatus ganglionar axilar (42,58,59, 65,80,115,170,177,178,180). Se observa mayor densidad vascular intratumoral en pacientes con metástasis axilar que en las que los ganglios no están afectados (90). En carcinomas ductales poco diferenciados la densidad microvascular elevada se relaciona con un número de ganglios axilares afectados superior a tres (99). Existe correlación evidente entre alta densidad microvascular media, tamaño tumoral, metástasis ganglionar axilar (58,59) y supervivencia (80,81). Esta correlación ha sido más significativa que la expresión de oncogenes en el cáncer de mama masculino (61,143). Varios autores encuentran una relación directa entre la densidad vascular intratumoral medida en los puntos calientes y el riesgo de metástasis ganglionar axilar en el cáncer mamario (121, 161,177,178). Estos hechos apoyan la validez de la angiogénesis como factor pronóstico en el cáncer de mama (21,47,65,80,81,99,177,178,180). Otros autores sin embargo encuentran relación entre densidad microvascular y grado tumoral, pero no con otros parámetros clásicos ni con la supervivencia (169) y otros niegan la correlación entre densidad vascular intratumoral y los parámetros clásicamente utilizados (tamaño tumoral, grado histológico y estatus ganglionar) (69,94,116,126,133,147).



La evidente discrepancia sobre el valor pronóstico de la angiogénesis en el cáncer mamario ha obligado a considerar cuáles son las causas que puedan motivarla.

La utilización por los autores de diferentes marcadores vasculares inmunohistoquímicos en la señalización de las áreas de mayor densidad microvascular es una posible causa de desacuerdo en los resultados (73). De los diferentes marcadores vasculares utilizados, el antígeno CD31 es el más específico y sensible (16,104,171).

Existen diferentes patrones angiogénicos y diferente expresión de antígenos endoteliales dependiendo del tipo histológico de cáncer mamario (31,103). La valoración angiogénica sobre carcinomas histológicamente heterogéneos puede inducir variaciones falsas en los resultados.

Aunque la distribución de las áreas calientes suele ser heterogénea en el cáncer mamario, algunos autores observan una mayor densidad de las mismas en los márgenes de crecimiento tumoral (16,57,58,178), mientras que otros las sitúan en las zonas centrales del tumor (9). Estos hechos condicionan una señalización anárquica de las áreas microvasculares a evaluar.

La subjetividad y variación interobservadores en la elección de las áreas calientes son factores importantes de discrepancia (21,113,126,133,147,178). Otros autores apuntan a la extrema variabilidad intraindividual existente en el coeficiente de variabilidad (63).

Las técnicas de valoración microscópica y morfométrica son factores importantes que influyen en la discrepancia en los resultados. Algunos trabajos establecen comparación entre los resultados obtenidos por diversos métodos evaluativos de las áreas de mayor densidad microvascular y encuentran diferencias significativas (177,36).

La estandarización de las técnicas de marcado y de contaje vascular, la homogenización histológica de carcinomas a estudiar y la estandarización de la técnica evaluadora de las áreas de mayor densidad microvascular, deben conducir a una reproducibilidad aceptable de los resultados (36,115) que establezca si la angiogénesis pueda ser incorporada como un factor pronóstico más con valor predictivo en el cáncer de mama (53).

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Hemos utilizado para el presente estudio 332 especímenes correspondientes a biopsias con tru-cut, tumorectomías, cuadrantectomías, mastectomías (simples o radicales) y linfadenectomías axilares de 189 pacientes remitidas al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena para su estudio entre los años 1996 y 2004. Se han descartado los casos con tumores multifocales, tipos histológicos diferentes al carcinoma ductal infiltrante clásico o tumores mixtos, casos tratados previamente con radioterapia o quimioterapia, lesiones con mala expresividad antigénica y casos con estatus ganglionar desconocido. Las piezas quirúrgicas, convenientemente seccionadas, se han sometido a fijación en una solución acuosa tamponada de formaldehído al 10% durante 24 horas. Una vez fijada, se ha medido el diámetro máximo tumoral macroscópico y se han obtenido secciones representativas de la lesión que incluyen el borde infiltrativo del tumor. Las muestras seleccionadas se han sometido a un proceso de inclusión en parafina en un procesador de tejidos automático durante 18 horas. De los bloques de parafina obtenidos se han realizado cortes histológicos de 3 micras de espesor montados sobre portaobjetos, que tras el desparafinado se tiñeron con el método de Hematoxilina – Eosina. De cada caso se obtuvieron cortes histológicos adicionales que se montaron sobre portas cargados eléctricamente para la determinación inmunohistoquímica de antígenos, utilizando el anticuerpo correspondiente frente a CD 31 (monoclonal, dilución 1:50). En 165 casos se realizó además dicha determinación inmunohistoquímica frente a los antígenos, p53 (monoclonal, no diluido), c-erb2 (monoclonal, no diluido) (Concepta Biosystems S.A., Barcelona) y antireceptores estrogénicos (dilución 1:40) (Novocastra Lab. Ltd. U.K.) en un procesador automático VENTANA ES (Ventana Medial Systems, Tucson, Arizona, USA), empleando el conjunto de detección Ventana Enhanced DAD, que incluye los siguientes componentes: Solución inhibidora de peróxido de hidrógeno, anticuerpo biotinilado antiratón, solución de peróxido de hidrógeno, DAD, solución de sulfato de cobre, hematoxilina y fondo azuleante. El desenmascaramiento antigénico se ha realizado mediante tampón citrato a PH 6, en olla a presión durante 4 minutos.

El estudio microscópico se ha realizado en un microscopio binocular Olympus BX 40 (Tokio, Japón). Sobre los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina Eosina se ha establecido en cada caso el grado histológico combinado de Nottingham (45). Asimismo se han correlacionado entre sí tamaño tumoral, grado histológico y sus componentes (formación de túbulos, grado nuclear e índice mitótico), estatus ganglionar axilar y número de ganglios afectados.

La valoración de la densidad microvascular tumoral se ha realizado, tanto en el grupo testigo como en cada uno de los 189 pacientes en dos fases:

- I. Identificación de las áreas de mayor densidad vascular (puntos calientes) mediante observación microscópica a 100 x (objetivo de 10 x y oculares de 10 x).
- II. Recuento vascular. Este se ha realizado en cada caso a 200 x en un campo microscópico de 0,916 mm<sup>2</sup>, a 400 x en un campo microscópico de 0,229 mm<sup>2</sup> y en tres campos microscópicos idénticos en puntos calientes diferentes, con cada uno de los aumentos referidos. Asimismo se ha obtenido la densidad media vascular del recuento obtenido con esta última sistemática con cada uno de los aumentos utilizados.

Se ha establecido un estudio comparativo entre las densidades vasculares (total y media), obtenidas mediante los seis métodos de recuento vascular utilizados, a fin de obtener el de mayor sensibilidad y especificidad.

Los valores obtenidos por el procedimiento más idóneo se han correlacionado con el tamaño tumoral, grado de diferenciación tubular, grado nuclear, índice mitótico, grado histológico, estatus ganglionar, número de ganglios afectados y en 165 casos además con la positividad o negatividad de las células tumorales frente a receptores estrogénicos, p53 y c-erb2. La determinación de receptores estrogénicos se ha realizado valorando el porcentaje de células tumorales teñidas y la intensidad de la tinción (102). La expresión de p53 en las células tumorales se ha reflejado en resultado positivo o negativo. La expresión de c-erb2 se ha considerado positiva cuando se ha apreciado tinción completa de la membrana en más del 10% de las células tumorales. Cuando la intensidad de la tinción ha sido leve o moderada la positividad se ha catalogado como débil y cuando dicha tinción ha sido fuerte, como intensa (134).

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS versión 12.0 para Windows. Los métodos utilizados han sido:

- I. En el caso de análisis de variables cualitativas o cuantitativas agrupadas en intervalos, se han calculado las Tablas de Contingencia u Homogeneidad con el Test de la Chi-cuadrado o en el caso de Tablas 2 x 2, con la corrección de continuidad.
- II. En el caso de comparación de variables cuantitativas según los grupos que establece una variable cualitativa, hemos utilizado el Análisis de la Varianza (ANOVA) y en el supuesto de obtener diferencias significativas hemos utilizado el Test de Comparaciones Múltiples de Bonferroni.

## **RESULTADOS**

### **Edad:**

La edad de las pacientes presenta un rango entre 32 y 85 años (edad media de 58,49 años). La incidencia mayor se encuentra en la década de los 50 (55 casos) (29,10%). Estos datos se reflejan en el gráfico 1.

**Lateralidad:**

La afectación de la mama izquierda (104 casos) (55,03%) es ligeramente superior a la de la derecha (85 casos) (44,97%).

**Tamaño tumoral (TT):**

El tamaño tumoral (en adelante TT) osciló entre 0,50 cm. y 13 cm. (tamaño tumoral medio (en adelante TTM) 2,65 cm.). En 7 casos (3,70%), el TT ha sido inferior a 1 cm. El grupo más numeroso corresponde a las lesiones de tamaño comprendido entre 1 y 2 cm. (87 casos) (46,03%), siendo casi equiparables los grupos de lesiones de tamaño comprendido entre los 2 y 3 cm. y los mayores de 3 cm. (49 y 46 casos respectivamente). Estos datos quedan reflejados en el gráfico 2.

**Características histológicas de los tumores estudiados:**

En los 189 carcinomas ductales infiltrantes estudiados se han valorado, desde el punto de vista histológico, el grado de formación tubular (en adelante FT), el grado nuclear (en adelante GN) y el índice mitótico (en adelante IM).

20 casos (10,58%) mostraron buena diferenciación tubular (en adelante FT1), 44 (23,28%) moderada (en adelante FT2) y 125 (66,14 %) escasa o nula (en adelante FT3).

41 tumores (21,69%) mostraron grado nuclear bajo (en adelante GN1), 103 (54,50%) moderado (en adelante GN2) y 45 (23,81 %) alto (en adelante GN3).

95 casos (50,26%) mostraron baja actividad mitótica (en adelante IM1), 45 (23,81%) moderada (en adelante IM2) y 49 (25,93%) alta (en adelante IM3).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 1.

| <b>FT</b>    |              | <b>GN</b>    |              | <b>IM</b>    |             |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>FT1</b>   | 20 (10,58%)  | <b>GN1</b>   | 41 (21,69%)  | <b>IM1</b>   | 95 (50,26%) |
| <b>FT2</b>   | 44 (23,28%)  | <b>GN2</b>   | 103 (54,50%) | <b>IM2</b>   | 45 (23,81%) |
| <b>FT3</b>   | 125 (66,14%) | <b>GN3</b>   | 45 (23,81%)  | <b>IM3</b>   | 49 (25,93%) |
| <b>Total</b> | <b>189</b>   | <b>Total</b> | <b>189</b>   | <b>Total</b> | <b>189</b>  |

**Tabla 1.- Características histológicas de los tumores**

**Tamaño tumoral (TT) y correlación con la formación tubular tumoral (FT):**

De los 94 casos con TT hasta 2 cm. (49,74%), 13 (13,83%) mostraron FT1, 21 (22,34%) FT2 y 60 (63,83%) FT3.

De los 95 casos con TT superior a 2 cm. (50,26%), 7 (7,37%) mostraron FT1, 22 (23,16%) FT2 y 66 (69,47%) FT3.

El TTM obtenido en los 20 casos (10,58%) con FT1 fue de  $2,12 \pm 1,30$  cm.,  $2,72 \pm 2,08$  cm. en los 43 casos (22,75%) con FT2 y  $2,70 \pm 1,87$  cm. en los 126 casos (66,67%) con FT3.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 2 y en el gráfico 5.

|              | TT (cm.)    |             | TTM (cm.)   | DT          | Total      |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|              | 0 - 2       | > 2         |             |             |            |
| <b>FT1</b>   | 13 (13,83%) | 7 (7,37%)   | 2,12        | 1,30        | <b>20</b>  |
| <b>FT2</b>   | 21 (22,34%) | 22 (23,16%) | 2,72        | 2,08        | <b>43</b>  |
| <b>FT3</b>   | 60 (63,83%) | 66 (69,47%) | 2,70        | 1,87        | <b>126</b> |
| <b>Total</b> | <b>94</b>   | <b>95</b>   | <b>2,64</b> | <b>1,87</b> | <b>189</b> |

**Tabla 2.- Correlación entre TT, TTM y FT**

**Tamaño Tumoral (TT) y correlación con el grado nuclear tumoral (GN):**

De los 94 casos con TT hasta 2 cm., 25 (26,59%) mostraron GN1, 52 (55,32%) GN2 y 17 (18,09%) GN3.

De los 95 casos con TT superior a 2 cm., 16 (16,84%) mostraron GN1, 51 (53,68%) GN2 y 28 (29,47%) GN3.

El TTM obtenido en los 41 casos con GN1 (21,69%) ha sido de  $2,13 \pm 1,04$  cm., en los 103 casos con GN2 (54,50%)  $2,56 \pm 1,88$  cm. y en los 45 casos con GN3 (23,81%)  $3,29 \pm 2,24$  cm. Estos resultados quedan reflejados en la tabla 3 y en el gráfico 6.

|            | TT (cm.)    |             | TTM (cm.) | DT   | Total      |
|------------|-------------|-------------|-----------|------|------------|
|            | 0 - 2       | > 2         |           |      |            |
| <b>GN1</b> | 25 (26,59%) | 16 (16,84%) | 2,13      | 1,04 | <b>41</b>  |
| <b>GN2</b> | 52 (55,32%) | 51 (53,68%) | 2,56      | 1,88 | <b>103</b> |
| <b>GN3</b> | 17 (18,09%) | 28 (29,47%) | 3,29      | 2,24 | <b>45</b>  |

|       |    |    |      |      |     |
|-------|----|----|------|------|-----|
| Total | 94 | 95 | 2,64 | 1,87 | 189 |
|-------|----|----|------|------|-----|

**Tabla 3.- Correlación entre TT, TTM y GN**

**Tamaño Tumoral (TT) y correlación con el índice mitótico tumoral (IM):**

De los 94 casos con TT hasta 2 cm., 56 (59,57%) mostraron IM1, 19 (20,21%) IM2 y 19 (20,21%) IM3.

De los 95 casos con TT superior a los 2 cm., 39 (41,05%) mostraron IM1, 26 (27,37%) IM2 y 30 (31,58%) IM3.

El TTM obtenido en los 95 casos con IM1 (50,26%) fue de  $2,14 \pm 1,2$  cm., en los 45 casos con IM2 (23,81%)  $3,17 \pm 2,3$  cm. y en los 49 casos con IM3 (25,93%)  $3,13 \pm 2,23$  cm. Estos resultados quedan reflejados en la tabla 4 y en el gráfico 7.

|              | TT (cm.)    |             | TTM (cm.)   | DT          | Total      |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|              | 0 - 2       | > 2         |             |             |            |
| IM1          | 56 (59,57%) | 39 (41,05%) | 2,14        | 1,2         | 95         |
| IM2          | 19 (20,21%) | 26 (27,37%) | 3,17        | 2,3         | 45         |
| IM3          | 19 (20,21%) | 30 (31,58%) | 3,13        | 2,23        | 49         |
| <b>Total</b> | <b>94</b>   | <b>95</b>   | <b>2,64</b> | <b>1,87</b> | <b>189</b> |

**Tabla 4.- Correlación entre TT, TTM e IM**

**Grado Histológico (GH):**

De los 189 casos, 62 (32,80%) mostraron grado histológico (en adelante GH) I, 72 (38,10%) GH II y 55 (29,10%) GH III (gráfico 3).

**Grado Histológico (GH) y correlación con el Tamaño Tumoral (TT):**

De los 94 casos con TT hasta 2 cm., 39 (62,90%) mostraron GH I, 33 (45,83%) GH II y 22 (40%) GH III.

De los 95 tumores con TT superior a 2 cm., 23 (37,10%) mostraron GH I, 39 (54,17%) GH II y 33 (60%) GH III.

El TTM obtenido en los 62 casos con GH I (32,80%) ha sido de  $1,97 \pm 0,95$  cm., en los 72 casos con GH II (38,09%)  $2,79 \pm 1,94$  cm. y en los 55 casos con GH III (29,10%)  $3,22 \pm 2,31$  cm. Estos resultados quedan reflejados en la tabla 5 y en los gráficos 8 y 9.

|               | TT ( cms )  |             | TTM ( cms ) | DT          | Total      |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|               | 0 - 2       | > 2         |             |             |            |
| <b>GH I</b>   | 39 (62,90%) | 23 (37,10%) | 1,97 cm.    | 0,95        | <b>62</b>  |
| <b>GH II</b>  | 33 (45,83%) | 39 (54,17%) | 2,79 cm.    | 1,94        | <b>72</b>  |
| <b>GH III</b> | 22 (40%)    | 33 (60%)    | 3,22 cm.    | 2,31        | <b>55</b>  |
| <b>Total</b>  | <b>94</b>   | <b>95</b>   | <b>2,64</b> | <b>1,87</b> | <b>189</b> |

**Tabla 5.- Correlación entre TT y GH**

**Grado Histológico (GH) y correlación con la formación tubular tumoral (FT):**

De los 62 tumores con GH I, 20 (32,25%) mostraron FT1, 17 (27,42%) FT2 y 25 (40,32%) FT3).

De los 72 tumores con GH II, ninguno (0%) mostró FT1, 22 (30,56%) FT2 y 50 (69,44%) FT3.

De los 55 tumores con GH III, ninguno (0%) mostró FT1, 4 (7,27%) FT2 y 51 (92,73%) FT3.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 6 y en el gráfico 10.

|              | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|--------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>FT1</b>   | 20(32,25%)  | 0 (0%)       | 0 (0%)        | <b>20</b>    |
| <b>FT2</b>   | 17(27,42%)  | 22 (30,56%)  | 4 (7,27%)     | <b>44</b>    |
| <b>FT3</b>   | 25(40,32%)  | 50 (69,44%)  | 51 (92,73%)   | <b>125</b>   |
| <b>Total</b> | <b>62</b>   | <b>72</b>    | <b>55</b>     | <b>189</b>   |

**Tabla 6.- Correlación entre GH y FT**

**Grado Histológico (GH) y correlación con el grado nuclear tumoral (GN):**

De los 62 tumores con GH I, 38 (61,29%) mostraron GN1, 24 (38,70%) GN2 y ninguno (0%) GN3.

De los 72 tumores con GH II, 3 (4,17%) mostraron GN1, 58 (80,56%) GN2 y 11 (15,28%) GN3.

De los 55 tumores con GH III, ninguno (0%) mostró GN1, 21 (38,18%) GN2 y 34 (61,81%).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 7 y en el gráfico 11.

|  | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|--|-------------|--------------|---------------|--------------|
|--|-------------|--------------|---------------|--------------|



|              |             |             |             |            |
|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>GN1</b>   | 38 (61,29%) | 3 (4,17%)   | 0 (0%)      | <b>41</b>  |
| <b>GN2</b>   | 24 (38,71%) | 58 (80,56%) | 21 (38,18%) | <b>102</b> |
| <b>GN3</b>   | 0 (0%)      | 11 (15,28%) | 34 (61,81%) | <b>46</b>  |
| <b>Total</b> | <b>62</b>   | <b>72</b>   | <b>55</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 7.- Correlación entre GH y GN**

**Grado Histológico (GH) y correlación con el índice mitótico tumoral (IM):**

De los 62 tumores con GH I, 61 (98,39%) mostraron IM1, 1 (1,61%) IM2 y ninguno (0%) mostró IM3.

De los 72 tumores con GH II, 34 (47,22%) mostraron IM1, 36 (50%) IM2 y 2 (2,78%) mostraron IM3. De los 55 tumores con GH III, ninguno mostró IM1 (0%) , 8 (14,55%) IM2 y 47 (85,45%) IM3.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 8 y en el gráfico 12.

|              | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|--------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>IM1</b>   | 61 (98,39%) | 34 (47,22%)  | 0 (0%)        | <b>95</b>    |
| <b>IM2</b>   | 1 (1,61%)   | 36 (50%)     | 8 (14,55%)    | <b>47</b>    |
| <b>IM3</b>   | 0 (0%)      | 2 (2,78%)    | 47 (85,45%)   | <b>47</b>    |
| <b>Total</b> | <b>62</b>   | <b>72</b>    | <b>55</b>     | <b>189</b>   |

**Tabla 8.- Correlación entre GH e IM**

**Estatus ganglionar axilar (EG):**

De los 189 pacientes estudiados, 95 (50,26%) mostraron ganglios axilares sin metástasis (en adelante G ( - )), mientras que los 94 (49,74%) restantes presentaron metástasis (en adelante G ( + )). De estos 94 pacientes, 46 (24,34%) mostraron menos de 4 G ( + ) y 48 (25,40%) presentaron más de 4 G ( + ) (gráfico 4).

**Estatus Ganglionar Axilar (EG) y correlación con Tamaño Tumoral (TT):**

De los 94 casos con TT hasta 2 cm., 57 (60,64%) mostraron G ( - ) y 37 (39,36%) G ( + ).

De los 95 casos con TT superior a 2 cm., 38 (40%) mostraron G ( - ) y 57 (60%) G ( + ).

El TTM obtenido en los 95 casos con G ( - ) ha sido de  $2,13 \pm 1,18$  cm. y el TTM obtenido en los 94 casos con G ( + ) ha sido de  $3,16 \pm 2,19$  cm.

De los 37 casos con G ( + ) y TT hasta 2 cm., 21 (22,34%) mostraron menos de 4 G ( + ) y 16 casos (17,02%) más de 4 G ( + ).

De los 57 casos con G ( + ) y TT superior a 2 cm., 25 (26,32%) mostraron menos de 4 G ( + ) y 32 (33,68%) más de 4 G ( + ).

El TMT obtenido en los casos con menos de 4 G ( + ) ha sido de  $2,74 \pm 1,79$  cm., frente a los  $3,55 \pm 2,59$  cm. obtenidos en las pacientes con más de 4 G ( + ). Las tablas 9 y 10 y los gráficos 13 y 14 reflejan estos resultados.

| EG           | TT (cm.)    |           | TTM (cm.)   | DT          | Total      |
|--------------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
|              | 0 - 2 cm.   | > 2 cm.   |             |             |            |
| G ( - )      | 57 (60,64%) | 38 (40%)  | 2,13        | 1,18        | 95         |
| G ( + )      | 37(39,36%)  | 57 (60%)  | 3,16        | 2,19        | 94         |
| <b>Total</b> | <b>94</b>   | <b>95</b> | <b>2,64</b> | <b>1,87</b> | <b>189</b> |

**Tabla 9.- Correlación entre EG ( 1 ), TT y TTM**

| EG           | TT (cm.)    |             | TTM (cm.)   | DT          | Total      |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|              | 0 - 2 cm.   | > 2 cm.     |             |             |            |
| G ( - )      | 57 (60,64%) | 38 (40%)    | 2,13        | 1,18        | 95         |
| G ( + ) < 4  | 21 (22,34%) | 25 (26,32%) | 2,74        | 1,79        | 46         |
| G ( + ) > 4  | 16 (17,02%) | 32 (33,68%) | 3,55        | 2,59        | 48         |
| <b>Total</b> | <b>94</b>   | <b>95</b>   | <b>2,64</b> | <b>1,87</b> | <b>189</b> |

**Tabla 10.- Correlación entre EG ( 2 ), TT y TTM**

### **Estatus ganglionar axilar (EG) y correlación con la formación tubular tumoral (FT):**

De los 95 casos con G ( - ), 14 (14,73%) mostraron FT1, 23 (24,21%) FT2 y 58 (61,05%) FT3.

De los 94 casos con G ( + ), 6 (6,38%) mostraron FT1, 21(22,34%) FT2 y 67 (71,27%) FT3.

De los 46 casos con menos de 4 G ( + ), 5 (10,87%) mostraron FT1, 13 (28,27%) FT2 y 28 (60,86%) FT3. De los 48 casos con más de 4 G ( + ), 1 (2,08%) mostró FT1, 8 (16,67%) FT2 y 39 (81,25%) FT3.

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 11 y 12 y en el gráfico 15.

|           |
|-----------|
| <b>EG</b> |
|-----------|

|              | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + )</b> | <b>Total</b> |
|--------------|----------------|----------------|--------------|
| <b>FT1</b>   | 14 (14,73%)    | 6 (6,38%)      | <b>20</b>    |
| <b>FT2</b>   | 23 (24,21%)    | 21 (22,34%)    | <b>44</b>    |
| <b>FT3</b>   | 58 (61,05%)    | 67 (71,28%)    | <b>125</b>   |
| <b>Total</b> | <b>95</b>      | <b>94</b>      | <b>189</b>   |

**Tabla 11.- Correlación entre EG ( 1 ) y FT**

| <b>EG</b>    |                |                      |                      |              |
|--------------|----------------|----------------------|----------------------|--------------|
|              | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + ) &lt;4</b> | <b>G ( + ) &gt;4</b> | <b>Total</b> |
| <b>FT1</b>   | 14 (14,73%)    | 5 (10,86%)           | 1 (2,08%)            | <b>20</b>    |
| <b>FT2</b>   | 23 (24,21%)    | 13 (28,26%)          | 8 (16,67%)           | <b>44</b>    |
| <b>FT3</b>   | 58 (61,05%)    | 28 (60,87%)          | 39 (81,25%)          | <b>125</b>   |
| <b>Total</b> | <b>95</b>      | <b>46</b>            | <b>48</b>            | <b>189</b>   |

**Tabla 12.- Correlación entre EG ( 2 ) y FT**

**Estatus ganglionar axilar (EG) y correlación con el grado nuclear tumoral (GN):**

De los 95 casos con G ( - ), 26 (27,37%), 55 (57,89%) GN2 y 14 (14,74%) GN3.

De los 94 casos con G ( + ), 15 (15,95%) mostraron GN1, 48 (51,06%) GN2 y 31 (32,97%) GN3. De los 46 casos con menos de 4 G ( + ), 10 (21,74%) mostraron GN1, 23 (50%) GN2 y 13 (28,26%) GN3. De los 48 casos con más de 4 G ( + ), 5 (10,42%) mostraron GN1, 25 (52,08%) GN2 y 18 (37,50%) GN3. Estos resultados quedan reflejados en las tablas 13 y 14 y en el gráfico 16.

| <b>EG</b>    |                |                |              |
|--------------|----------------|----------------|--------------|
|              | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + )</b> | <b>Total</b> |
| <b>GN1</b>   | 26 (27,36%)    | 15 (15,95%)    | <b>41</b>    |
| <b>GN2</b>   | 55 (57,89%)    | 48 (51,06%)    | <b>103</b>   |
| <b>GN3</b>   | 14 (14,74%)    | 31 (32,98%)    | <b>45</b>    |
| <b>Total</b> | <b>95</b>      | <b>94</b>      | <b>189</b>   |

**Tabla 13.- Correlación entre EG ( 1 ) y GN**

| <b>EG</b>    |                |                      |                      |              |
|--------------|----------------|----------------------|----------------------|--------------|
|              | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + ) &lt;4</b> | <b>G ( + ) &gt;4</b> | <b>Total</b> |
| <b>GN1</b>   | 26 (27,36%)    | 10 (21,74%)          | 5 (10,41%)           | <b>41</b>    |
| <b>GN2</b>   | 55 (57,89%)    | 23 (50%)             | 25 (52,08%)          | <b>103</b>   |
| <b>GN3</b>   | 14 (14,74%)    | 13 (28,26%)          | 18 (37,50%)          | <b>45</b>    |
| <b>Total</b> | <b>95</b>      | <b>46</b>            | <b>48</b>            | <b>189</b>   |

**Tabla 14.- Correlación entre EG ( 2 ) y GN**

**Estatus ganglionar axilar (EG) y correlación con el índice mitótico tumoral (IM):**

De los 95 casos con G ( - ), 57 (60%) mostraron IM1, 19 (20%) IM2 y 19 (20%) IM3.

De los 94 casos con G ( + ), 38 (40,43%) mostraron IM1, 26 (27,65%) IM2 y 30 (31,92%) IM3. De los 46 casos con menos de 4 G ( + ), 23 (50%) mostraron IM1, 11 (23,91%) IM2 y 12 (26,09%) IM3. De los 48 casos con más de 4 G ( + ), 15 (31,25%) mostraron IM1, 15 (31,25%) IM2 y 18 (37,5%) IM3.

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 15 y 16 y en el gráfico 17.

| EG           |           |             |            |
|--------------|-----------|-------------|------------|
|              | G ( - )   | G ( + )     | Total      |
| <b>IM1</b>   | 57 (60%)  | 38 (40,43%) | <b>95</b>  |
| <b>IM2</b>   | 19 (20%)  | 26 (27,66%) | <b>45</b>  |
| <b>IM3</b>   | 19 (20%)  | 30 (31,91%) | <b>49</b>  |
| <b>Total</b> | <b>95</b> | <b>94</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 15.- Correlación entre EG ( 1 ) e IM**

| EG           |           |             |             |            |
|--------------|-----------|-------------|-------------|------------|
|              | G ( - )   | G ( + ) <4  | G ( + ) >4  | Total      |
| <b>IM1</b>   | 57 (60%)  | 23 (50%)    | 15 (31,25%) | <b>41</b>  |
| <b>IM2</b>   | 19 (20%)  | 11 (23,91%) | 15 (31,25%) | <b>103</b> |
| <b>IM3</b>   | 19 (20%)  | 12 (26,08%) | 18 (37,50%) | <b>45</b>  |
| <b>Total</b> | <b>95</b> | <b>46</b>   | <b>48</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 16.- Correlación entre EG ( 2 ) e IM**

**Estatus ganglionar axilar (EG) y correlación con Grado Histológico (GH):**

De los 95 pacientes con G ( - ), 42 casos (44,22%) mostraron GH I, 31 casos (32,63%) GH II y 22 casos (23,16%) GH III.

De los 94 pacientes con G ( + ), 20 (21,28%) mostraron GH I, 41 (43,62%) GH II y 33 (35,11%) GH III. Los 46 pacientes con menos de 4 G ( + ) presentaron GH I

en 16 casos (34,78%), GH II en 17 casos (36,96%) y GH III en los 13 casos restantes (28,26%). Los 48 casos con más de 4 G ( + ) mostraron 4 con GH I (8,33%), 24 (50%) con GH II, y 20 (41,66%) con GH III.

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 17 y 18 y en el gráfico 18.

| EG            |             |             |            |
|---------------|-------------|-------------|------------|
|               | G ( - )     | G ( + )     | Total      |
| <b>GH I</b>   | 42 (44,21%) | 20 (21,28%) | <b>62</b>  |
| <b>GH II</b>  | 31 (32,63%) | 41 (43,61%) | <b>72</b>  |
| <b>GH III</b> | 22 (23,16%) | 33 (35,11%) | <b>55</b>  |
| <b>Total</b>  | <b>95</b>   | <b>94</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 17.- Correlación entre EG ( 1 ) y GH**

| EG            |             |             |             |            |
|---------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|               | G ( - )     | G ( + ) <4  | G ( + ) >4  | Total      |
| <b>GH I</b>   | 42 (44,21%) | 16 (34,78%) | 4 (8,33%)   | <b>62</b>  |
| <b>GH II</b>  | 31 (32,63%) | 17 (36,96%) | 24 (50%)    | <b>72</b>  |
| <b>GH III</b> | 22 (23,16%) | 13 (28,26%) | 20 (41,67%) | <b>55</b>  |
| <b>Total</b>  | <b>95</b>   | <b>46</b>   | <b>48</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 18.- Correlación entre EG ( 2 ) y GH**

### **Expresión inmunohistoquímica de los casos estudiados:**

De los 165 casos en los que pudo realizarse estudio inmunohistoquímico, 139 (84,24%) mostraron inmunopositividad frente a Receptores Estrogénicos (en adelante RE ( + ) y 26 (15,75%) no (en adelante RE ( - )), 85 (51,52%) mostraron inmunopositividad frente a p53 (en adelante p53 ( + )), y 80 (48,48%) no (en adelante p53 ( - )), 57 (34,55%) expresaron inmunopositividad frente a c-erb2 ( en adelante c-erb2 ( + )) y 108 (65,45%) no (en adelante c-erb2 ( - )).

### **Expresión inmunohistoquímica y estatus ganglionar axilar (EG):**

En los 165 pacientes en los que pudo realizarse estudio inmunohistoquímico valorable, 84 (50,91%) mostraron G ( - ) y 81(49,09%) G ( + ). En este últimos grupo , 38 (23,03%) tenían menos de 4 G ( + ) y los 43 restantes (26,06%), más de 4 G ( + ) (gráfico 19).

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) :**

139 tumores (84,24%) mostraron RE ( + ) en las células neoplásicas y 26 casos (15,76%) no expresaron RE .

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con Tamaño Tumoral (TT):**

De los 80 casos con TT hasta 2 cm., 11 (13,75%) no expresaron RE y 69 (86,25%) sí.

De los 85 casos con TT superior a 2 cm., 15 (17,65%) no expresaron RE y 70 (82,35%) sí.

El TTM obtenido en los 26 casos con RE ( - ) ha sido  $3,14 \pm 2,48$  cm. y el TTM obtenido en los 139 casos con RE ( + )  $2,64 \pm 1,84$  cm.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 19 y en el gráfico 20.

| TT       | TT (cm.)    |             | DT   | TTM (cm.) | Total |
|----------|-------------|-------------|------|-----------|-------|
|          | 0 - 2       | > 2         |      |           |       |
| RE ( - ) | 11 (13,75%) | 15 (17,65%) | 2,48 | 3,14      | 26    |
| RE ( + ) | 69 (86,25%) | 70 (82,35%) | 1,84 | 2,64      | 139   |
| Total    | 80          | 85          | 1,95 | 2,72      | 165   |

*Tabla 19.- Correlación entre expresión de RE, TT y TTM*

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con formación tubular tumoral (FT):**

De los 19 tumores con FT1, ninguno mostró RE ( - ) y todos expresaron RE ( + ) (100%).

De los 37 tumores con FT2, 4 (10,81%) fueron RE ( - ) y 33 (89,19%) RE ( + ).

De los 109 tumores con FT3, 22 (20,18%) fueron RE ( - ) y 87 (79,82%) RE ( + ).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 20 y en el gráfico 21.

|          | FT1       | FT2         | FT3         | Total |
|----------|-----------|-------------|-------------|-------|
| RE ( - ) | 0 (0%)    | 4 (10,81%)  | 22 (20,18%) | 26    |
| RE ( + ) | 19 (100%) | 33 (89,19%) | 87 (79,82%) | 139   |
| Total    | 19        | 37          | 109         | 165   |

*Tabla 20.- Correlación entre expresión de RE y FT*

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con grado nuclear tumoral (GN):**

De los 36 tumores con GN1, 1 (2,78% mostró RE (-) y 35 (97,22%) RE (+).

De los 92 tumores con GN2, 13 (14,13%) no expresaron RE y 79 (85,87%) sí.

De los 37 tumores con GN3, 12 (32,43%) fueron RE (-) y 25 (67,57%) RE (+).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 21 y en el gráfico 22.

|               | <b>GN1</b>  | <b>GN2</b>  | <b>GN3</b>  | <b>Total</b> |
|---------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>RE (-)</b> | 1 (2,78%)   | 13 (14,13%) | 12 (32,43%) | <b>26</b>    |
| <b>RE (+)</b> | 35 (97,22%) | 79 (85,87%) | 25 (67,57%) | <b>139</b>   |
| <b>Total</b>  | <b>36</b>   | <b>92</b>   | <b>37</b>   | <b>165</b>   |

*Tabla 21.- Correlación entre expresión de RE y GN*

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con índice mitótico tumoral (IM):**

De los 83 tumores con IM1, 7 (8,43%) mostraron RE (-) y 76 (91,57%) RE (+).

De los 37 tumores con IM 2, 5 (13,51%) mostraron RE (-) y 32 (86,49%) RE (+).

De los 45 tumores con IM3, 14 (31,11%) mostraron RE (-) y 31 (68,89%) RE (+).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 22 y en el gráfico 23.

|               | <b>IM1</b>  | <b>IM2</b>  | <b>IM3</b>  | <b>Total</b> |
|---------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>RE (-)</b> | 7 (8,43%)   | 5 (13,51%)  | 14 (31,11%) | <b>26</b>    |
| <b>RE (+)</b> | 76 (91,57%) | 32 (86,49%) | 31 (68,89%) | <b>139</b>   |
| <b>Total</b>  | <b>83</b>   | <b>37</b>   | <b>45</b>   | <b>165</b>   |

*Tabla 22.- Correlación entre expresión de RE e IM*

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con Grado Histológico (GH):**

De los 55 casos con GH I, 2 (3,64%) no expresaron RE y 53 (96,36%) sí.

De los 60 casos con GH II, 8 (13,33%) mostraron RE (-) y 52 (86,67%) RE (+)

De los 50 casos con GH III, 16 (32%) mostraron RE (-) y 34 (68%) RE (+).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 23 y en el gráfico 24.

|                 | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|-----------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>RE ( - )</b> | 2 (3,64%)   | 8 (13,33%)   | 16 (32%)      | <b>26</b>    |
| <b>RE ( + )</b> | 53 (96,36%) | 52 (86,67%)  | 34 (68%)      | <b>139</b>   |
| <b>Total</b>    | <b>55</b>   | <b>60</b>    | <b>50</b>     | <b>165</b>   |

**Tabla 23.- Correlación entre expresión de RE y GH**

### **Expresión de Receptores Estrogénicos (RE) y correlación con Estatus Ganglionar Axilar (EG):**

De los 84 casos con G ( - ) , 11 (13,09%) mostraron RE ( - ) y 73 (86,90%) RE ( + ).

De los 81 casos con G ( + ) , 14 (17,28%) mostraron RE ( - ) y 67 (82,72%) G ( + ).

De los 38 casos con menos de 4 G ( + ) , 2 (5,26%) mostraron RE ( - ) y 36 (94,74%) RE ( + ). De los 43 casos con más de 4 G ( + ) , 12 (27,91%) mostraron RE ( - ) y 31 (72,09%) RE ( + ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 24 y 25 y en el gráfico 25.

| <b>EG</b>       |                |                |              |
|-----------------|----------------|----------------|--------------|
|                 | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + )</b> | <b>Total</b> |
| <b>RE ( - )</b> | 11 (13,09%)    | 14 (17,28%)    | <b>26</b>    |
| <b>RE ( + )</b> | 73 (86,90%)    | 67 (82,72%)    | <b>139</b>   |
| <b>Total</b>    | <b>84</b>      | <b>81</b>      | <b>165</b>   |

**Tabla 24.- Correlación entre expresión de RE y EG ( 1 )**

| <b>EG</b>       |                |                       |                       |              |
|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|                 | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + ) &lt; 4</b> | <b>G ( + ) &gt; 4</b> | <b>Total</b> |
| <b>RE ( - )</b> | 11 (13,09%)    | 2 (5,26%)             | 12 (27,91%)           | <b>26</b>    |
| <b>RE ( + )</b> | 73 (86,90%)    | 36 (94,74%)           | 31 (72,09%)           | <b>139</b>   |
| <b>Total</b>    | <b>84</b>      | <b>38</b>             | <b>43</b>             | <b>165</b>   |

**Tabla 25.- Correlación entre expresión de RE y EG ( 2 )**

### **Expresión de p53:**

85 casos (51,52%) fueron p53 ( + ) y 80 (48,48%) p53 ( - ).

### **Expresión de p53 y correlación con Tamaño Tumoral (TT):**



De los 80 casos con TT hasta 2 cm., 35 (43,75%) no mostraron expresión de p53 y 45 (56,25%) sí.

De los 85 casos con TT superior a 2 cm., 45 (52,94%) mostraron p53 ( - ) y 40 (47,06%) p53 ( + ).

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 26 y en el gráfico 26.

|                  | TT (cm.)    |             | TTM (cm.)   | DE          | Total      |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                  | 0 - 2       | > 2         |             |             |            |
| <b>p53 ( - )</b> | 35 (43,75%) | 45 (52,94%) | 2,9         | 2,09        | <b>80</b>  |
| <b>p53 ( + )</b> | 45 (56,25%) | 40 (47,06%) | 2,55        | 1,81        | <b>85</b>  |
| <b>Total</b>     | <b>80</b>   | <b>85</b>   | <b>2,72</b> | <b>1,95</b> | <b>165</b> |

**Tabla 26.- Correlación entre expresión de p53 y TT**

**Expresión de p53 y correlación con formación tubular tumoral (FT):**

De los 19 casos con FT1, 11 (57,89%) no expresaron p53 y 8 (42,11%) sí.

De los 37 casos con FT2, 13 (35,14%) no expresaron p53 y 24 (64,86%) sí.

De los 109 casos con FT3, 56 (51,38%) no expresaron p53 y 53 (48,62%) sí.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 27 y en el gráfico 27.

|                  | FT1         | FT2         | FT3         | Total      |
|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>p53 ( - )</b> | 11 (57,89%) | 13 (35,14%) | 56 (51,38%) | <b>80</b>  |
| <b>p53 ( + )</b> | 8 (42,11%)  | 24 (64,86%) | 53 (48,62%) | <b>85</b>  |
| <b>Total</b>     | <b>19</b>   | <b>37</b>   | <b>109</b>  | <b>165</b> |

**Tabla 27.- Correlación entre expresión de p53 y FT**

**Expresión de p53 y correlación con grado nuclear tumoral (GN):**

De los 36 casos con GN1, 22 (61,11%) no expresaron p53 y 14 (38,89%) sí.

De los 92 casos con GN2, 42 (45,65%) no expresaron p53 y 50 (54,35%) sí.

De los 37 casos con GN3, 16 (43,24%) no expresaron p53 ( - ) y 21 (56,76%) sí.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 28 y en el gráfico 28.

|                  | GN1         | GN2         | GN3         | Total      |
|------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>p53 ( - )</b> | 22 (61,11%) | 42 (45,65%) | 16 (43,24%) | <b>80</b>  |
| <b>p53 ( + )</b> | 14 (38,89%) | 50 (54,35%) | 21 (56,76%) | <b>85</b>  |
| <b>Total</b>     | <b>36</b>   | <b>92</b>   | <b>37</b>   | <b>165</b> |

**Tabla 28.- Correlación entre expresión de p53 y GN**

**Expresión de p53 y correlación con índice mitótico tumoral (IM):**

De los 83 casos con IM1, 40 (48,19%) no expresaron p53 y 43 (51,81%) sí.

De los 37 casos con IM2, 16 (43,24%) no expresaron p53 y 21 (56,76%) sí.

De los 45 casos con IM3, 24 (53,33%) no expresaron p53 y 21 (46,67%) sí.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 29 y en el gráfico 29.

|                  | <b>IM1</b>  | <b>IM2</b>  | <b>IM3</b>  | <b>Total</b> |
|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>p53 ( - )</b> | 40 (48,19%) | 16 (43,24%) | 24 (53,33%) | <b>80</b>    |
| <b>p53 ( + )</b> | 43 (51,81%) | 21 (56,76%) | 21 (46,67%) | <b>85</b>    |
| <b>Total</b>     | <b>83</b>   | <b>37</b>   | <b>45</b>   | <b>165</b>   |

**Tabla 29.- Correlación entre expresión de p53 e IM**

**Expresión de p53 y correlación con Grado Histológico (GH):**

De los 55 casos con GH I, 30 (54,55%) no expresaron p53 y 25 (45,45%) sí.

De los 60 casos con GH II, 25 (41,67%) no expresaron p53 y 35 (58,33%) sí.

De los 50 casos con GH III, 25 (50%) no expresaron p53 y 25 (50%) sí.

Estos resultados quedan reflejados en la tabla 30 y en el gráfico 30.

|                  | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>p53 ( - )</b> | 30 (54,55%) | 25 (41,67%)  | 25 (50%)      | <b>80</b>    |
| <b>p53 ( + )</b> | 25 (45,45%) | 35 (58,33%)  | 25 (50%)      | <b>85</b>    |
| <b>Total</b>     | <b>55</b>   | <b>60</b>    | <b>50</b>     | <b>165</b>   |

**Tabla 30.- Correlación entre expresión de p53 y GH**

**Expresión de p53 y correlación con Estatus ganglionar axilar (EG):**

De los 84 casos con G ( - ), 40 (47,62%) no expresaron p53 y 44 (52,38%) sí.

De los 85 casos con G ( + ), 40 (49,38%) no expresaron p53 y 41 (50,62%) sí.

De los 38 casos con menos de 4 G ( + ), 18 (47,37%) no expresaron p53 y 20 (52,63%) sí. De los 43 casos con más de 4 G ( + ), 22 (51,16%) no expresaron p53 y 21 (48,83%) sí.

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 31 y 32 y en el gráfico 31.

| EG      |             |             |       |
|---------|-------------|-------------|-------|
|         | G (-)       | G (+)       | Total |
| p53 (-) | 40 (47,62%) | 40 (49,38%) | 80    |
| p53 (+) | 44 (52,38%) | 41 (50,62%) | 85    |
| Total   | 84          | 81          | 165   |

**Tabla 31.- Correlación entre expresión de p53 y EG ( 1 )**

| EG      |             |             |             |       |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------|
|         | G (-)       | G (+) < 4   | G (+) > 4   | Total |
| p53 (-) | 40 (47,62%) | 18 (47,37%) | 22 (51,16%) | 80    |
| p53 (+) | 44 (52,38%) | 20 (52,63%) | 21 (48,84%) | 85    |
| Total   | 84          | 38          | 43          | 165   |

**Tabla 32.- Correlación entre expresión de p53 y EG ( 2 )**

### **Expresión de c-erb2:**

57 casos (34,55%) han sido cerb2 (+). De estos, 20 casos (35,09%) mostraron una reacción inmunohistoquímica débil y 37 (64,92%) la mostraron fuerte. 108 casos (65,45%) no expresaron c-erb2.

### **Expresión de c-erb2 y correlación con Tamaño Tumoral (TT):**

De los 80 casos con TT hasta 2 cm., 60 (75%) no expresaron c-erb2 y 20 (25%) sí.

De los 85 casos con TT superior a 2 cm., 48 (56,47%) no expresaron c-erb2 y 37 (43,53%) sí.

El TTM obtenido en los 108 casos cerb2 (-) ha sido  $2,49 \pm 1,88$  cm. y el TTM obtenido en los 57 casos c-erb2 (+)  $3,12 \pm 2,05$  cm.

De los 20 casos c-erb2 (+) con TT hasta 2 cm., 7 (8,75%) mostraron expresión débil (en adelante c-erb2 (1+)) y 13 (16,25%) mostraron expresión fuerte (en adelante c-erb2 (2+)). De los 37 tumores con c-erb2 (+) y TT superior a 2 cm., 13 (15,29%) mostraron c-erb2 (1+) y 24 (28,24%) c-erb2 (2+).

El TTM obtenido en los 20 casos con c-erb2 (1+) ha sido  $2,99 \pm 2,03$  cm. y el TTM obtenido en los 37 casos con c-erb2 (2+) ha sido de  $3,24 \pm 2,19$  cm.

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 33 y 34 y en el gráfico 32.

|  | TT (cm.) | TTM (cm.) | DT | Total |
|--|----------|-----------|----|-------|
|  |          |           |    |       |

|                    | 0 - 2     | > 2         |             |             |            |
|--------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>cerb2 ( - )</b> | 60 (75%)  | 48 (56,47%) | 2,49        | 1,88        | <b>108</b> |
| <b>cerb2 ( + )</b> | 20 (25%)  | 37 (43,53%) | 3,12        | 2,11        | <b>57</b>  |
| <b>Total</b>       | <b>80</b> | <b>85</b>   | <b>2,72</b> | <b>1,95</b> | <b>165</b> |

**Tabla 33.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y TT**

|                     | TT (cm.)    |             | TTM (cm.)   | DT          | Total      |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                     | 0 - 2       | > 2         |             |             |            |
| <b>cerb2 ( - )</b>  | 60 (75%)    | 48 (56,47%) | 2,49 cm.    | <b>1,88</b> | <b>108</b> |
| <b>cerb2 ( 1+ )</b> | 7 (8,75%)   | 13 (15,29%) | 2,99 cm.    | <b>2,03</b> | <b>20</b>  |
| <b>cerb2 ( 2+ )</b> | 13 (16,25%) | 24 (28,24%) | 3,24 cm.    | <b>2,19</b> | <b>37</b>  |
| <b>Total</b>        | <b>80</b>   | <b>85</b>   | <b>2,72</b> | <b>1,95</b> | <b>165</b> |

**Tabla 34.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y TT**

**Expresión de c- erb2 y correlación con formación tubular tumoral (FT):**

De los 18 casos con FT1, 14 (77,78%) no expresaron c-erb2 y 4 (22,22%) sí.

De los 37 casos con FT2, 29 (78,40%) no expresaron c-erb2 y 8 (21,60%) sí.

De los 110 casos con FT3 ,65 (59,10%) no expresaron c-erb2 y 45 (40,90%) sí.

De los 4 casos con FT1, 1 (1,75%) mostró c-erb2 ( 1 + ) y 3 (5,26%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 8 casos con FT2, 2 (3,51%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 6 (10,53%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 45 casos con FT3, 17 (29,82%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 28 (49,12%) c-erb2 ( 2 + ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 35 y 36 y en el gráfico 33.

|                     | FT1         | FT2         | FT3         | Total      |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 14 (77,78%) | 29 (78,38%) | 65 (50,09%) | <b>108</b> |
| <b>c-erb2 ( + )</b> | 4 (22,22%)  | 8 (21,62%)  | 45 (40,91%) | <b>57</b>  |
| <b>Total</b>        | <b>18</b>   | <b>37</b>   | <b>110</b>  | <b>165</b> |

**Tabla 35 .- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y FT**

|                     | FT1         | FT2         | FT3         | Total      |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 14 (77,78%) | 29 (78,38%) | 65 (50,09%) | <b>108</b> |
| <b>cerb2 ( 1+ )</b> | 1 (5,56%)   | 2 (5,41%)   | 17 (15,45%) | <b>20</b>  |
| <b>cerb2 ( 2+ )</b> | 3 (16,67%)  | 6 (16,22%)  | 28 (25,45%) | <b>37</b>  |
| <b>Total</b>        | <b>18</b>   | <b>37</b>   | <b>110</b>  | <b>165</b> |

**Tabla 36.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y FT**

### **Expresión de c-erb2 y correlación con grado nuclear tumoral (GN):**

De los 36 tumores con GN1, 27 (75%) no expresaron c-erb2 y 9 (25%) sí.

De los 92 tumores con GN2, 59 (64,13%) no expresaron c-erb2 y 33 (35,87%) sí.

De los 37 tumores con GN3, 22 (59,50%) no expresaron c-erb2 y 15 (40,5%) sí.

De los 8 casos con GN1, 3 (5,26%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 5 (8,77%) c-erb2 ( 2 + ).

De los 34 casos con GN2, 13 (22,81%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 21 (36,84%) c-erb2 ( 2 + ).

De los 15 casos con GN3, 4 (7,02%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 11 (19,30%) c-erb2 ( 2+ ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 37 y 38 y en el gráfico 34.

|                     | <b>GN1</b> | <b>GN2</b>  | <b>GN3</b>  | <b>Total</b> |
|---------------------|------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 27 (75%)   | 59 (64,13%) | 22 (59,50%) | <b>108</b>   |
| <b>c-erb2 ( + )</b> | 9 (25%)    | 33 (35,87%) | 15 (42,86%) | <b>57</b>    |
| <b>Total</b>        | <b>36</b>  | <b>92</b>   | <b>37</b>   | <b>165</b>   |

**Tabla 37.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y GN**

|                     | <b>GN1</b>   | <b>GN2</b>  | <b>GN3</b>  | <b>Total</b> |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 27 (77,14%)  | 61 (64,21%) | 20 (57,14%) | <b>108</b>   |
| <b>cerb2 ( 1+ )</b> | 3 ( 8,57 % ) | 13 (13,68%) | 4 (11,43%)  | <b>20</b>    |
| <b>cerb2 ( 2+ )</b> | 5 (14,29%)   | 21 (22,11%) | 11 (31,43%) | <b>37</b>    |
| <b>Total</b>        | <b>35</b>    | <b>95</b>   | <b>35</b>   | <b>165</b>   |

**Tabla 38.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y GN**

### **Expresión de c -erb2 y correlación con índice mitótico tumoral (IM):**

De los 83 casos con IM1, 58 (69,90%) no expresaron c-erb2 y 25 (30,10%) sí.

De los 37 casos con IM2, 24 (64,86%) no expresaron c-erb2 y 13 (35,14%) sí.

De los 45 casos con IM3, 26 (57,80%) no expresaron c-erb2 y 19 (42,20%) sí.

De los 24 casos con IM1, 9 (15,79%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 15 (26,32%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 14 casos con IM2, 3 (5,26%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 11 (19,30%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 19 casos con IM3, 8 (14,04%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 11 (29,73%) c-erb2 ( 2 + ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 39 y 40 y en el gráfico 35.

|                     | IM1         | IM2         | IM3         | Total      |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 58 (70,73%) | 24 (64,84%) | 26 (57,78%) | <b>108</b> |
| <b>c-erb2 ( + )</b> | 25 (30,10%) | 13 (35,14%) | 19 (42,22%) | <b>57</b>  |
| <b>Total</b>        | <b>83</b>   | <b>37</b>   | <b>45</b>   | <b>165</b> |

**Tabla 39.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) e IM**

|                      | IM1         | IM2         | IM3         | Total      |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b>  | 58 (70,73%) | 24 (64,84%) | 26 (57,78%) | <b>108</b> |
| <b>c-erb2 ( 1+ )</b> | 9 (15,79%)  | 3 (5,26%)   | 8 (14,04%)  | <b>20</b>  |
| <b>c-erb2 ( 2+ )</b> | 15 (26,32%) | 11 (19,30%) | 11 (29,73%) | <b>37</b>  |
| <b>Total</b>         | <b>83</b>   | <b>37</b>   | <b>45</b>   | <b>165</b> |

**Tabla 40.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) e IM**

#### **Expresión de c-erb2 y correlación con Grado Histológico (GH):**

De los 55 casos con GH I, 45 (81,8%) no expresaron c-erb2 y 10 (18,20%) sí.

De los 60 casos con GH II, 33 (55%) no expresaron c-erb2 y 27 (45%) sí.

De los 50 casos con GH III, 30 (60%) no expresaron c-erb2 y 20 (40%) sí.

De los 9 casos con GH I, 4 (7,02%) mostraron c-erb2 ( 1 + ) y 5 (8,77%) c-erb2 ( 2 + ).

De los 28 casos con GH II, 9 (15,79%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 19 (33,33%) c-erb2 ( 2 + ).

De los 20 casos con GH III, 7 (12,28%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 13 (22,81%) c-erb2 ( 2 + ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 41 y 42 y en el gráfico 36.

|                    | GH I        | GH II     | GH III    | Total      |
|--------------------|-------------|-----------|-----------|------------|
| <b>cerb2 ( - )</b> | 45 (81,82%) | 33 (55%)  | 30 (60%)  | <b>108</b> |
| <b>cerb2 ( + )</b> | 10 (18,18%) | 27 (45%)  | 20 (40%)  | <b>57</b>  |
| <b>Total</b>       | <b>55</b>   | <b>60</b> | <b>50</b> | <b>165</b> |

**Tabla 41.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y GH**

|                     | <b>GH I</b> | <b>GH II</b> | <b>GH III</b> | <b>Total</b> |
|---------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>cerb2 ( - )</b>  | 45 (83,33%) | 33 (54,10%)  | 30 (60%)      | <b>108</b>   |
| <b>cerb2 ( 1+ )</b> | 4 (7,41%)   | 9 (14,75%)   | 7 (14%)       | <b>20</b>    |
| <b>cerb2 ( 2+ )</b> | 5 (9,26%)   | 19 (31,15%)  | 13 (26%)      | <b>37</b>    |
| <b>Total</b>        | <b>54</b>   | <b>61</b>    | <b>50</b>     | <b>165</b>   |

**Tabla 42.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y GH**

**Expresión de c-erb2 y correlación con Estatus ganglionar axilar (EG):**

De los 85 casos con G ( - ), 60 (70,60%) no expresaron c-erb2 y 25 (29,4%) sí.

De los 80 casos con G ( + ), 47 (58,75%) no expresaron c-erb2 y 33 (41,25%) sí.

De los 37 casos con menos de 4 G ( + ), 24 ( 64,86 % ) no expresaron c-erb2 y 13 (35,14%) sí.

De los 43 casos con más de 4 G ( + ), 23 (53,5%) no expresaron c-erb2 y 20 (46,5%) sí.

De los 25 casos con G ( - ), 7 (12,28%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 18 (31,58%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 32 casos con G ( + ), 13 (22,81%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 19 (33,33%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 13 casos con menos de 4 G ( + ), 8 (14,04%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 5 (8,77%) c-erb2 ( 2+ ).

De los 20 casos con más de 4 G ( + ), 5 (8,77%) mostraron c-erb2 ( 1+ ) y 15 (26,31%) c-erb2 ( 2+ ).

Estos resultados quedan reflejados en las tablas 43, 44, 45 y 46 y en el gráfico 37.

| <b>EG</b>          |                |                |              |
|--------------------|----------------|----------------|--------------|
|                    | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + )</b> | <b>Total</b> |
| <b>cerb2 ( - )</b> | 60 (70,59%)    | 47 (58,75%)    | <b>108</b>   |
| <b>cerb2 ( + )</b> | 25 (29,41%)    | 33 (41,25%)    | <b>57</b>    |
| <b>Total</b>       | <b>85</b>      | <b>80</b>      | <b>165</b>   |

**Tabla 43.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y EG**

| <b>EG</b>          |                |                       |                       |              |
|--------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|                    | <b>G ( - )</b> | <b>G ( + ) &lt; 4</b> | <b>G ( + ) &gt; 4</b> | <b>Total</b> |
| <b>cerb2 ( - )</b> | 60 (70,59%)    | 24 (64,86%)           | 23 (53,50%)           | <b>108</b>   |
| <b>cerb2 ( + )</b> | 25 (29,41%)    | 13 (34,20%)           | 20 (46,50%)           | <b>57</b>    |
| <b>Total</b>       | <b>85</b>      | <b>37</b>             | <b>43</b>             | <b>165</b>   |

**Tabla 44.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y EG**

| EG           |             |             |            |
|--------------|-------------|-------------|------------|
|              | G ( - )     | G ( + )     | Total      |
| cerb2 ( - )  | 60 (70,59%) | 47 (58,75%) | <b>108</b> |
| cerb2 ( 1+ ) | 7 (12,28%)  | 13 (22,81%) | <b>57</b>  |
| cerb2 ( 2+ ) | 18 (31,58%) | 19 (33,33%) | <b>165</b> |
| Total        | <b>85</b>   | <b>80</b>   | <b>43</b>  |

**Tabla 45.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 3 ) y EG**

| EG           |             |             |             |            |
|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|              | G ( - )     | G ( + ) < 4 | G ( + ) > 4 | Total      |
| cerb2 ( - )  | 60 (70,59%) | 24 (64,86%) | 23 (53,50%) | <b>108</b> |
| cerb2 ( 1+ ) | 7 (8,24%)   | 8 (14,04%)  | 5 (8,77%)   | <b>20</b>  |
| cerb2 ( 2+ ) | 18 (21,18%) | 5 (8,77%)   | 15 (26,31%) | <b>37</b>  |
| Total        | <b>85</b>   | <b>37</b>   | <b>43</b>   | <b>165</b> |

**Tabla 46.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 4 ) y EG**

#### **Densidad Vascular (DV):**

La densidad vascular total (en adelante DVT), obtenida mediante recuento en un campo microscópico de 200 x sobre punto caliente, en los 189 casos ha sido de 16223, obteniéndose una densidad vascular media (en adelante DVM) de 85,83. La DVT obtenida mediante recuento en tres campos microscópicos de 200 x en puntos calientes diferentes ha sido de 44721, obteniéndose una DVM de 236,62. La DVT obtenida mediante el procedimiento anterior obteniendo el valor medio ha sido de 14827,43, obteniéndose una DVM de 78,45.

La DVT obtenida mediante recuento en un campo microscópico de 400 x sobre punto caliente en los 189 casos ha sido de 8112, obteniéndose una DVM de 42,92.

La DVT obtenida mediante recuento en tres campos microscópicos de 400 x sobre puntos calientes diferentes ha sido de 24473, obteniéndose una DVM de 129,49.

La DVT obtenida mediante el procedimiento anterior obteniendo el valor medio ha sido de 8137,07, obteniéndose una DVM de 43,05.

En el gráfico 38 quedan reflejados estos resultados.



### **Determinación del método idóneo de recuento vascular:**

El estudio comparativo de los valores de las DVT y DVM obtenidas por los seis métodos de recuento utilizados demuestra una sensibilidad y especificidad similares, si bien el recuento sobre el mejor punto caliente a 400 x se revela como ligeramente superior al resto de los métodos. El recuento vascular medio en tres puntos calientes a 200 x ofrece la mayor dispersión de resultados. El coeficiente de correlación de Pearson establece un alto grado de concordancia entre los diversos métodos utilizados, lo que queda reflejado gráficamente en la curva COR correspondiente (gráfico 39). La DVT (8112 vasos) y DVM (42,92 vasos) con una Desviación Típica de 26,78 obtenidas mediante el recuento vascular sobre el mejor punto caliente a 400 x, serán pues los valores utilizados para establecer el estudio comparativo entre la DV y los diferentes parámetros. La DVT obtenida mediante la misma metodología en 30 lobulillos mamarios normales (grupo testigo) ha sido de 420 vasos y la DVM  $14 \pm 3,40$  vasos.

| <b>n = 189</b>     | <b>1 / 200 x</b> | <b>3 / 200 x</b> | <b>3 / 200 x (m)</b> | <b>1 / 400 x</b> | <b>3 / 400x</b> | <b>3 / 400 x (m)</b> |
|--------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|-----------------|----------------------|
| <b>DVT (vasos)</b> | 16223            | 44721            | 148227,43            | 8112             | 24473           | 8137,07              |
| <b>DVM (vasos)</b> | 85,83            | 236,62           | 78,45                | 42,92            | 129,49          | 43,05                |

### **Correlación entre DVT, DVM y tamaño tumoral (TT):**

En los 94 casos con TT hasta 2 cm. se obtuvo una DVT de 3622 vasos y una DVM de  $38,53 \pm 24,58$  vasos. Los 95 casos con TT superior a 2 cm. mostraron una DVT de 4490 vasos y una DVM de  $47,26 \pm 28,27$  vasos.

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 47 y 48 y en los gráficos 40 y 41.

| <b>TT</b>         | <b>Nº</b>  | <b>DVT</b>  | <b>DVM</b>   | <b>DT</b>    |
|-------------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>0- 2 cm.</b>   | 94         | 3622        | 38,53        | 24,58        |
| <b>&gt; 2 cm.</b> | 95         | 4490        | 47,26        | 28,27        |
| <b>Total</b>      | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,78</b> |

**Tabla 47. Correlación entre DV y TT**

| Intervalo vascular |                |           |             |             |           |             |              |
|--------------------|----------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|--------------|
| TT                 | N <sup>a</sup> | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        | DE           |
| 0- 2 cm.           | 94             | 28 (56%)  | 29 (51,79%) | 25 (60,98%) | 3 (15%)   | 9 (40,91%)  | 24,58        |
| > 2 cm.            | 95             | 22 (44%)  | 27 (48,21%) | 16 (39,02%) | 17 (85%)  | 13 (59,09%) | 28,27        |
| <b>Total</b>       | <b>189</b>     | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   | <b>26,78</b> |

**Tabla 48.- Correlación entre TT y DV por intervalos**

**Correlación entre DVT , DVM y formación tubular tumoral (FT):**

En los 20 casos con FT1 se obtuvo una DVT de 479 vasos y una DVM de 23,95 ± 12,62 vasos. Los 43 casos con FT2 mostraron una DVT de 1788 vasos y una DVM de 41,57 ± 24,03 vasos y los 126 casos con FT3 presentaron una DVT de 5845 vasos y una DVM de 46,38 ± 28,14 vasos.

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 49 y 50 y en los gráficos 42 y 43.

|              | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>FT1</b>   | 20         | 479         | 23,95        | 12,62        |
| <b>FT2</b>   | 43         | 1788        | 41,57        | 24,03        |
| <b>FT3</b>   | 126        | 5845        | 46,38        | 28,14        |
| <b>Total</b> | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,79</b> |

**Tabla 49.- Correlación entre DV y FT**

| Intervalo vascular |                |           |             |             |           |             |
|--------------------|----------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
|                    | N <sup>a</sup> | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        |
| <b>FT1</b>         | <b>20</b>      | 10 (20%)  | 8 (14,29%)  | 2 (4,88%)   | 0 (0%)    | 0 (0%)      |
| <b>FT2</b>         | <b>43</b>      | 12 (24%)  | 9 (16,07%)  | 14 (34,15%) | 6 (30%)   | 2 (9,09%)   |
| <b>FT3</b>         | <b>126</b>     | 28 (56%)  | 39 (69,64%) | 25 (60,98%) | 14 (70%)  | 20 (90,91%) |
| <b>Total</b>       | <b>189</b>     | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   |

**Tabla 50.- Correlación entre FT y DV por intervalos**

**Correlación entre DVT, DVM y grado nuclear (GN):**

En los 41 casos con GN1 se obtuvo una DVT de 1176 casos y una DVM de 28,68 ± 18,56 vasos. Los 103 casos con GN2 mostraron una DVT de 4279

vasos y una DVM de  $41,54 \pm 25,41$  vasos. Los 45 casos con GN3 presentaron una DVT de 2657 vasos y una DVM de  $59,04 \pm 28,24$  vasos.

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente queda reflejada en la tablas 51 y 52 y en los gráficos 44 y 45.

|              | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DE           |
|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>GN1</b>   | 41         | 1176        | 28,68        | 18,56        |
| <b>GN2</b>   | 103        | 4279        | 41,54        | 25,41        |
| <b>GN3</b>   | 45         | 2657        | 59,04        | 28,24        |
| <b>Total</b> | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,79</b> |

**Tabla 51.- Correlación entre DV y GN**

| Intervalo vascular |            |           |             |             |           |             |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
|                    | Nº         | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        |
| <b>GN1</b>         | 41         | 19 (38%)  | 11 (19,64%) | 8(19,51%)   | 3 (15%)   | 0 (0%)      |
| <b>GN2</b>         | 103        | 28 (56%)  | 34 (60,71%) | 21 (51,22%) | 10 (50%)  | 10 (45,45%) |
| <b>GN3</b>         | 45         | 3 (6%)    | 11 (19,64%) | 12 (29,27%) | 7 (35%)   | 12 ( 4,55%) |
| <b>Total</b>       | <b>189</b> | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   |

**Tabla 52.- Correlación entre GN y DV por intervalos**

### **Correlación entre DVT, DVM e índice mitótico tumoral (IM):**

En los 91 casos con IM1 se obtuvo una DVT de 3168 vasos y una DVM de  $33,35 \pm 20,10$  vasos. Los 45 casos con IM2 mostraron una DVT de 1988 vasos y una DVM de  $44,18 \pm 23,92$  vasos y los 49 casos con IM3 presentaron una DVT de 2956 vasos y una DVM de  $60,33 \pm 31,67$  vasos.

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 53 y 54 y en los gráficos 46 y 47.

|              | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DE           |
|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>IM1</b>   | 95         | 3168        | 33,35        | 20,1         |
| <b>IM2</b>   | 45         | 1988        | 44,18        | 23,92        |
| <b>IM3</b>   | 49         | 2956        | 60,33        | 31,67        |
| <b>Total</b> | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,79</b> |

**Tabla 53.- Correlación entre DV e IM**

| Intervalo vascular |            |           |             |             |           |             |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
|                    | Nº         | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        |
| <b>IM1</b>         | 95         | 35 (70%)  | 30 (53,57%) | 20 (48,78%) | 8 (40%)   | 2 (9,09%)   |
| <b>IM2</b>         | 45         | 10 (20%)  | 12 (21,43%) | 12 (29,27%) | 7 (35%)   | 4 (18,18%)  |
| <b>IM3</b>         | 49         | 5 (10%)   | 14 (25%)    | 9 (21,95%)  | 5 (25%)   | 16 (72,73%) |
| <b>Total</b>       | <b>189</b> | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   |

**Tabla 54.- Correlación entre IM y DV por intervalos**

**Correlación entre DVT, DVM y grado histológico (GH):**

La DVT obtenida en los 62 tumores GH I ha sido de 1852 vasos y la DVM de  $29,87 \pm 18,64$  vasos. En los 72 tumores con GH II, la DVT ha sido de 3011 vasos y la DVM de  $41,82 \pm 22,09$  vasos. En los 55 tumores con GH III, la DVT ha sido de 3249 vasos y la DVM de  $59,07 \pm 31,65$  vasos.

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 55 y 56 y los gráficos 48 y 49.

|               | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|---------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>GH I</b>   | 62         | 1852        | 29,87        | 18,64        |
| <b>GH II</b>  | 72         | 3011        | 41,82        | 22,09        |
| <b>GH III</b> | 55         | 3249        | 59,07        | 31,65        |
| <b>Total</b>  | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,79</b> |

**Tabla 55.- Correlación entre DV y GH**

| Intervalo vascular |            |           |             |             |           |            |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|
|                    | Nº         | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80       |
| <b>GH I</b>        | 62         | 27 (54%)  | 19 (33,93%) | 11 (26,83%) | 5 (25%)   | 0 (0%)     |
| <b>GH II</b>       | 72         | 16 (32%)  | 23 (41,07%) | 19 (46,34%) | 9 (45%)   | 5 (22,73%) |
| <b>GH III</b>      | 55         | 7 (14%)   | 14 (25%)    | 11 (26,83%) | 6 (30%)   | 17(77,27%) |
| <b>Total</b>       | <b>189</b> | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>  |

**Tabla 56.- Correlación entre GH y DV por intervalos**

**Correlación entre DVT, DVM y Estatus Ganglionar Axilar (EG):**

En los 95 casos con G ( - ) se ha obtenido una DVT de 2439 vasos y una DVM de  $25,67 \pm 15,30$  vasos. Los 94 casos con G ( + ) mostraron una DVT de 5673

vasos y una DVM de  $60,35 \pm 25,89$  vasos. Los 46 casos con menos de 4 G ( + ) presentaron una DVT de 2367 vasos una DVM de  $51,46 \pm 26,46$  vasos. En los 48 casos con más de 4 G ( + ) se obtuvo una DVT de 3306 vasos y una DVM de  $68,88 \pm 25,32$ .

La distribución por intervalos de los recuentos vasculares obtenidos en los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 57, 58, 59 y 60 y en los gráficos 50 y 51.

|                | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|----------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>G ( - )</b> | 95         | 2439        | 25,67        | 15,30        |
| <b>G ( + )</b> | 94         | 5673        | 60,35        | 25,89        |
| <b>Total</b>   | <b>189</b> | <b>8112</b> | <b>42,92</b> | <b>26,79</b> |

**Tabla 57.- Correlación entre DV y EG ( 1 )**

| Intervalo vascular |           |             |             |           |             |            |
|--------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|------------|
|                    | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        | Total      |
| <b>G ( - )</b>     | 48 (96%)  | 33 (58,92%) | 12 (29,27%) | 1 (5%)    | 1 (4,55%)   | <b>95</b>  |
| <b>G ( + )</b>     | 2 (4%)    | 23 (41,07%) | 29 (70,73%) | 19 (95%)  | 21 (95,45%) | <b>94</b>  |
| <b>Total</b>       | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 58.- Correlación entre EG ( 1 ) y DV por intervalos**

|                       | Nº         | DVT ( vasos ) | DVM ( vasos ) | DT           |
|-----------------------|------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>G ( - )</b>        | 95         | 2439          | 25,67         | 15,30        |
| <b>G ( + ) &lt; 4</b> | 46         | 2367          | 51,46         | 26,46        |
| <b>G ( + ) &gt; 4</b> | 48         | 3306          | 68,88         | 25,32        |
| <b>Total</b>          | <b>189</b> | <b>8112</b>   | <b>42,92</b>  | <b>26,79</b> |

**Tabla 59.- Correlación entre DV y EG ( 2 )**

| Intervalo vascular    |           |             |             |           |             |            |
|-----------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|------------|
|                       | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80        | Total      |
| <b>G ( - )</b>        | 48 (96%)  | 33 (58,92%) | 12 (29,27%) | 1 (5%)    | 1 (4,55%)   | <b>95</b>  |
| <b>G ( + ) &lt; 4</b> | 1 (2%)    | 17(30,36%)  | 17(41,46%)  | 6 (30%)   | 5 (22,73%)  | <b>46</b>  |
| <b>G ( + ) &gt;4</b>  | 1 (2%)    | 6 (10,71%)  | 12 (29,27%) | 13 (65%)  | 16 (72,73%) | <b>48</b>  |
| <b>Total</b>          | <b>50</b> | <b>56</b>   | <b>41</b>   | <b>20</b> | <b>22</b>   | <b>189</b> |

**Tabla 60.- Correlación entre EG ( 2 ) y DV por intervalos**

### **Correlación entre DVT, DVM y expresión de Receptores Estrogénicos (RE):**

La DVT obtenida en los 26 casos con RE ( - ) ha sido de 1347 vasos y la DVM  $51,81 \pm 30,29$  vasos.

La DVT obtenida en los 139 casos con RE ( + ) ha sido de 5691 vasos y la DVM 40,94 ± 25,97 vasos.

La distribución por intervalos de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 61 y 62 y los gráficos 52 y 53.

|              | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| RE ( - )     | 26         | 1347        | 51,81        | 30,29        |
| RE ( + )     | 139        | 5691        | 40,94        | 25,97        |
| <b>Total</b> | <b>165</b> | <b>7038</b> | <b>42,65</b> | <b>26,89</b> |

**Tabla 61.- Correlación entre DV y expresión de RE**

| <b>Intervalo vascular</b> |             |           |            |           |           |            |
|---------------------------|-------------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
|                           | 0 - 20      | 21 - 40   | 41 - 60    | 61 - 80   | > 80      | Total      |
| RE ( - )                  | 5 (11,36%)  | 8 (16%)   | 4 (11,43%) | 4 (25%)   | 5 (25%)   | <b>26</b>  |
| RE ( + )                  | 39 (88,64%) | 42 (84%)  | 31(88,57%) | 12 (75%)  | 15 (75%)  | <b>139</b> |
| <b>Total</b>              | <b>44</b>   | <b>50</b> | <b>35</b>  | <b>16</b> | <b>20</b> | <b>165</b> |

**Tabla 62.- Correlación entre expresión de RE y DV por intervalos**

### **Correlación entre DVT,DVM y expresión de p53:**

La DVT obtenida en los 80 casos con p53 ( - ) ha sido de 3313 vasos y la DVM 41,41 ± 26,75 vasos.

La DVT obtenida en los 85 casos con p53 ( + ) ha sido de 3735 vasos y la DVM 43,81 ± 27,14 vasos.

La distribución por intervalos de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 63 y 64 y en los gráficos 54 y 55.

|              | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| p53 ( - )    | 80         | 3313        | 41,41        | 26,75        |
| p53 ( + )    | 85         | 3725        | 43,81        | 27,14        |
| <b>Total</b> | <b>165</b> | <b>7038</b> | <b>42,65</b> | <b>26,89</b> |

**Tabla 63.- Correlación entre DV y expresión de p53**

| <b>Intervalo vascular</b> |             |           |             |           |           |            |
|---------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-----------|------------|
|                           | 0 - 20      | 21 - 40   | 41 - 60     | 61 - 80   | > 80      | Total      |
| p53 ( - )                 | 25 (56,82%) | 21 (42%)  | 18 (51,43%) | 8 (50%)   | 8 (40%)   | <b>26</b>  |
| p53 ( + )                 | 19 (43,18%) | 29 (58%)  | 17 (48,57%) | 8 (50%)   | 12 (60%)  | <b>139</b> |
| <b>Total</b>              | <b>44</b>   | <b>50</b> | <b>35</b>   | <b>16</b> | <b>20</b> | <b>165</b> |

**Tabla 64.- Correlación entre expresión de p53 y DV por intervalos**

**Correlación entre DVT, DVM y expresión de c-erb2:**

La DVT obtenida en los 69 casos con c-erb2 ( - ) ha sido de 2992 vasos y la DVM  $43,35 \pm 27,70$  vasos.

La DVT obtenida en los 57 casos con c-erb2 ( + ) ha sido de 2506 vasos y la DVM  $42,15 \pm 26,43$  vasos. La DVT obtenida en los 20 casos con c-erb2 ( + ) débil ha sido de 857 vasos y la DVM de  $42,85 \pm 26,38$  vasos. La DVT obtenida en los 37 casos con c-erb2 ( + ) intenso ha sido de 1649 vasos y la DVM  $44,56 \pm 26,57$  vasos.

La distribución por intervalos de los resultados obtenidos en cada uno de los grupos considerados anteriormente quedan reflejados en las tablas 65, 66, 67 y 68 y en los gráficos 56 y 57.

|                     | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|---------------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 69         | 2992        | 43,35        | 27,7         |
| <b>c-erb2 ( + )</b> | 96         | 4046        | 42,15        | 26,43        |
| <b>Total</b>        | <b>165</b> | <b>7038</b> | <b>42,65</b> | <b>26,89</b> |

**Tabla 65.- Correlación entre DV y expresión de c-erb2 ( 1 )**

| Intervalo vascular  |           |             |             |             |             |            |
|---------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                     | 0 - 20    | 21 - 40     | 41 - 60     | 61 - 80     | > 80        | Total      |
| <b>c-erb2 ( - )</b> | 30 (75%)  | 31 (60,78%) | 20 (62,50%) | 13 (68,42%) | 14 (60,86%) | <b>108</b> |
| <b>c-erb2 ( + )</b> | 10 (25%)  | 20 (39,22%) | 12 (37,50%) | 6 (31,58%)  | 9 (39,13%)  | <b>57</b>  |
| <b>Total</b>        | <b>40</b> | <b>51</b>   | <b>32</b>   | <b>19</b>   | <b>23</b>   | <b>165</b> |

**Tabla 66.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 1 ) y DV por intervalos**

|                      | Nº         | DVT (vasos) | DVM (vasos)  | DT           |
|----------------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| <b>c-erb2 ( - )</b>  | 108        | 2992        | 43,35        | 27,70        |
| <b>c-erb2 ( 1+ )</b> | 20         | 857         | 42,85        | 26,38        |
| <b>c-erb2 ( 2+ )</b> | 37         | 1649        | 44,56        | 26,57        |
| <b>Total</b>         | <b>165</b> | <b>5498</b> | <b>42,65</b> | <b>26,89</b> |

**Tabla 67.- Correlación entre DV y expresión de c-erb2 ( 2 )**

| Intervalo vascular    |         |            |            |            |            |            |
|-----------------------|---------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                       | 0 - 20  | 21 - 40    | 41 - 60    | 61 - 80    | > 80       | Total      |
| <b>c-erb2 ( - )</b>   | 30(75%) | 31(60,78%) | 20(62,50%) | 13(68,42%) | 14(60,86%) | <b>108</b> |
| <b>c-erb2 ( 1 + )</b> | 2(5%)   | 9(17,65%)  | 4(12,50%)  | 3(15,78%)  | 2(8,70%)   | <b>20</b>  |
| <b>c-erb2 ( 2 + )</b> | 8(20%)  | 11(21,57%) | 8(25%)     | 3(15,78%)  | 7(30,43%)  | <b>37</b>  |

|       |    |    |    |    |    |     |
|-------|----|----|----|----|----|-----|
| Total | 40 | 51 | 32 | 19 | 23 | 165 |
|-------|----|----|----|----|----|-----|

**Tabla 68.- Correlación entre expresión de c-erb2 ( 2 ) y DV por intervalos**

La investigación del valor pronóstico de la densidad vascular intratumoral en el cáncer mamario ha obtenido resultados contradictorios (9,21,58,60,73,74,94,147,149,169,115,116,126) y se ha responsabilizado a la heterogeneidad de la metodología utilizada de la discrepancia en los resultados



(113,123,178). Se ha cuantificado la densidad vascular determinando el número de vasos por mil células tumorales (99). Este método minimiza las variaciones en el recuento vascular derivadas del tamaño del campo microscópico, de la relación parénquima tumoral – estroma y del tamaño de las células tumorales y se correlaciona bien con otros factores pronósticos pero su aplicación supone un consumo de tiempo que lo hace poco práctico. El método más aplicado consiste en el recuento vascular sobre las zonas con mayor densidad vascular, denominadas “puntos calientes”. La subjetividad en la elección de estos “puntos calientes” parece ser el principal factor responsable de la disparidad de resultados (16,21,113,126,133,171,172,178). Aunque se han conseguido recuentos vasculares más objetivos utilizando técnicas de morfometría (58). y de procesado de imágenes (14,34,69,166) combinadas con el marcaje inmunohistoquímico de los vasos (16,95) y se ha propuesto la selección automática de los “puntos calientes” para resolver la subjetividad de su elección (14,171,172), la investigación en este sentido no ha proporcionado resultados fiables (16,58,166), por lo que actualmente no existe ningún método que sea capaz de definir objetivamente cual o cuales son los puntos calientes más idóneos para realizar el recuento vascular.

El marcaje inmunohistoquímico de los vasos con un anticuerpo idóneo previo al recuento vascular (171,178), la cuidadosa selección de los puntos calientes adecuados, un protocolo estricto para definir los vasos (36) y una adecuada área de observación (36,58,178), permiten obtener una densidad vascular tumoral fiable y reproducible (36,115) equiparable a la obtenida por técnicas de análisis de imagen (16).

Teniendo en cuenta estas recomendaciones, para determinar la densidad vascular de nuestros tumores hemos contado manualmente los vasos existentes en los mejores “puntos calientes” elegidos subjetivamente según el protocolo propuesto por WEIDNER (178) con algunas modificaciones. Se ha sustituido como marcador vascular el antígeno relacionado con el Factor VIII por CD31, una glicoproteína de membrana, específica de la célula endotelial y localizada en sus uniones intercelulares (38,104), selectiva de los vasos sanguíneos (86,125), ampliamente consensuada como el marcador panendotelial más sensible (30,171).

Asimismo hemos modificado la metodología en la elección del “punto caliente” con mayor densidad vascular. La exploración de los “puntos calientes” con objetivo de bajo aumento (4 x) (178) puede resultar engañosa debido a que, a este aumento no es posible determinar si el marcaje inmunohistoquímico es realmente vascular o no. Las células plasmáticas muestran una tinción lineal yuxtannuclear (16,104). La agrupación de dichas células en áreas tumorales (hecho relativamente frecuente) proporciona una falsa imagen de “punto caliente” con alta densidad vascular. Los histiocitos y a veces las células neoplásicas intraductales expresan inmunotinción citoplasmática y de membrana respectivamente, pueden contribuir más raramente a amplificar esa falsa imagen. Asimismo áreas con pocos vasos de cierto tamaño muy ramificados pueden simular áreas con elevada densidad vascular. Por todos estos motivos hemos utilizado un objetivo de 10 x como señalizador de los puntos calientes idóneos ya que a este aumento si pueden diferenciarse los simuladores vasculares referidos.

Se han propuesto diferentes métodos para determinar la densidad vascular sobre puntos calientes. La Reunión del Colegio de Patólogos Americanos para consensuar los factores pronósticos en el cáncer mamario, incluye la valoración la angiogénesis dentro del grupo de factores no suficientemente estudiados en cuanto a su valor pronóstico y propone tres métodos : densidad vascular en un “punto caliente” , densidad vascular media en tres puntos calientes y la mayor densidad vascular en tres “puntos calientes” sin hacer recomendaciones sobre el tamaño del campo microscópico ni de los aumentos utilizados (53).

Diversos trabajos establecen una correlación estadísticamente significativa entre densidad vascular determinada sobre “punto caliente”, incidencia de metástasis y supervivencia utilizando métodos de recuento vascular diferentes (36,178). Parece establecido que la densidad vascular obtenida sobre “punto caliente” puede adquirir un valor pronóstico no alcanzado por el recuento vascular obtenido de forma global en el área tumoral (36). Asimismo existe consenso sobre la importancia crítica que adquiere el área de observación sobre la que se realiza el recuento vascular, de forma que áreas de observación de tamaño excesivo diluyen el número de vasos y áreas demasiado pequeñas establecen diferencias significativas en el recuento vascular por lo que el valor predictivo de la densidad vascular obtenida disminuye cuando el área del campo

microscópico es inferior a  $0,19 \text{ mm}^2$  y alcanza su mayor valor predictivo alrededor de  $0,70 \text{ mm}^2$  (36,178). Hemos obtenido la densidad vascular sobre el mejor “punto caliente”, sobre los tres mejores “puntos calientes” y el valor medio resultante del recuento vascular en los tres mejores “puntos calientes” mediante la observación microscópica a 200 x (campo microscópico de  $0,916 \text{ mm}^2$ ) y a 400 x (campo microscópico de  $0,229 \text{ mm}^2$ ). Con el coeficiente de correlación de Pearson se demuestra buena sensibilidad y especificidad de los tres métodos, con resultados prácticamente superpuestos, salvo en el recuento vascular en los tres mejores “puntos calientes” a 200 x. La explicación a esta discrepancia puede ser el aumento de la subjetividad al tener que elegir más de un “punto caliente” y a la dilución del número de vasos al ser el campo microscópico superior a los  $0,70 \text{ mm}^2$  (36,178). Estos resultados han determinado nuestra elección del recuento vascular sobre el mejor “punto caliente” a 400 x como el método más práctico y rápido e idénticamente reproducible al obtenido a 200 x en las mismas condiciones considerado de mayor significación estadística (178). No hemos encontrado mayor incidencia de “puntos calientes” en el margen infiltrativo tumoral (178) sino una distribución heterogénea de los mismos en el tumor (9).

Se ha demostrado una DV constante, así como una relación homogénea con las áreas acinares y el estroma en los lobulillos mamarios normales (119), por lo que hemos utilizado los recuentos vasculares en 30 lobulillos mamarios normales como grupo testigo. La DVM obtenida es significativamente menor ( $12,36 \pm 1,11$  vasos) que la observada en los tumores.

### **Correlación entre los factores pronósticos morfológicos:**

Diferentes parámetros histológicos han sido investigados, de forma singular o combinada, para determinar su valor pronóstico y/o predictivo en pacientes con cáncer de mama. El tamaño tumoral, estatus ganglionar axilar, grado nuclear, grado histológico, índice mitótico, tipo histológico y la expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona) han demostrado su valor pronóstico y su utilidad clínica en el tratamiento de las pacientes (53).

El **Tamaño Tumoral (TT)** es un importante factor predictivo de metástasis ganglionar axilar y de supervivencia (88), incluso en carcinomas con TT inferior

a 1 cm. (28). La disminución de la supervivencia a partir de los 2 cm. es independiente del estatus ganglionar axilar (1,12,175). Para otros el TT carece de valor pronóstico (47).

La escasa representatividad de nuestra muestra con TT inferior a 1 cm. (7 casos) no permite obtener conclusiones significativas al correlacionarlos con otros factores pronósticos, por lo que hemos preferido incluirlos en la serie de casos con TT hasta 2 cm. La mayor incidencia de casos con buena diferenciación histológica (FT1,GN1,IM1) está asociada a la serie de menor TT e inversamente, los tumores poco diferenciados (FT3,GN3,IM3) inciden en mayor número en la serie con mayor TT. Sin embargo la correlación entre TT, FT y GN no es estadísticamente significativa ( $p = 0,349$  y  $p = 0,097$  respectivamente). Aunque se observa un incremento progresivo del TTM paralelo a la progresiva pérdida de FT, las diferencias no son significativas ( $p = 0,421$ ). Este mismo comportamiento del TTM en relación con un aumento progresivo del GN sí es estadísticamente significativo ( $p = 0,013$ ). El IM se correlaciona significativamente tanto con el TT como con el TTM ( $p = 0,037$  y  $p = 0,001$  respectivamente).

El TT está relacionado con el EG (1). La correlación obtenida en nuestro estudio es estadísticamente significativa ( $p = 0,007$ ) entre el grupo de casos con G ( - ) y la serie de menor TT y entre el grupo con G ( + ) y la serie con mayor TT. Dicha correlación se incrementa cuando se establece con el TTM ( $p = 0,000$ ).

**El Grado Histológico (GH)** ha mostrado una correlación estrecha con el pronóstico (51,12,45,47) y con determinadas características clínicas (22,51) en el cáncer de mama y se ha constatado su valor pronóstico independiente con respecto al EG y GN (45,51). No obstante, el grado de concordancia interobservadores al evaluar el GH oscila entre el 54% (35) y el 78,1%, lo que disminuye su utilidad clínica (33). La investigación de esta discrepancia ha demostrado que factores técnicos influyen de forma importante en la valoración del GN e IM (45,64,136,149,167,168) y que su control mejora la coincidencia interobservadores hasta un 83,3% (136).

El GH evalúa simultáneamente y de forma semicuantitativa tres características morfológicas interrelacionadas del tumor: Formación Tubular (FT), atipia nuclear

(GN) e índice mitótico (IM) (45). Aunque se ha asignado idéntica contribución de cada uno de estos factores al GH final (45), el valor independiente de cada uno de ellos está poco establecido (175). Análisis por separado de cada uno de ellos obtienen un valor predictivo diferente (12,13,30,124,136,167,168). El hallazgo de un patrón tubular bien diferenciado (FT1) se ha asociado a buen pronóstico (124) y el patrón tubular escasamente diferenciado (FT3) asociado a un grado nuclear alto (GN3) a una baja supervivencia (137). El IM es el factor pronóstico más fiable (12,47) y el mejor correlacionado con el Estatus Ganglionar (29,30,167,168) por lo que para algunos autores es el mayor responsable del GH final (175). El GN ha sido considerado largo tiempo como un factor pronóstico muy importante (19,159). Mientras que los criterios para la valoración del patrón tubular y del conteo de mitosis están bien establecidos (12,13,45,124,136,149), la evaluación del GN es bastante subjetiva, lo que condiciona una elevada discordancia interobservadores (40). Sin embargo se ha demostrado su valor pronóstico independiente con técnicas objetivas de morfometría (12,97).

Hemos obtenido una correlación estadísticamente significativa ( $p = 0,000$ ) entre el GH combinado (45) y cada uno de sus parámetros de forma independiente. La existencia de FT1 es exclusiva de los tumores GH I. Nuestros resultados demuestran buena correlación independiente entre cada uno de los parámetros y el GH final, coincidente con la obtenida por otros autores (22,45,51).

La correlación entre GH, TT y TTM es estadísticamente significativa ( $p = 0,033$  y  $0,001$  respectivamente). La diferencia entre la incidencia de casos es significativa cuando se relaciona el grupo GH I con los grupos GH II y GH III. Sin embargo no se aprecian diferencias significativas cuando la relación se establece entre los grupos GH II y GH III. El incremento del TTM paralelo al aumento del GH obtenido en nuestro estudio ha sido comunicado por otros autores (22).

**El Estatus Ganglionar Axilar (EG)** es el factor pronóstico independiente más importante en las pacientes con cáncer de mama (43). La incidencia de recidivas y una supervivencia menor están directamente relacionadas con la afectación tumoral de los ganglios axilares (12,53,150,167) y el pronóstico empeora cuando son más de cuatro los ganglios afectados (53, 173).

En nuestro estudio el EG se correlaciona con el TT y TTM con significación estadística ( $p = 0,007$  y  $p = 0,000$  respectivamente). Cuando la relación se establece con los grupos con diferente número de G ( + ) es asimismo estadísticamente significativa ( $p = 0,009$  y  $p = 0,000$  respectivamente). Esta relación se pierde al comparar entre sí los grupos con diferente número de G ( + ) ( $p = 0,089$ ) y entre el grupo de G ( - ) y los grupos referidos ( $p = 0,05$  en ambos).

Nuestros datos demuestran diferencias significativas entre el EG encontrado en los grupos con diferente GH ( $p = 0,001$ ). Cuando la relación se establece con los grupos con diferente número de G ( + ) las diferencias son más significativas en el grupo con GH I y similares en los grupos restantes.

Hemos obtenido correlación significativa entre EG, GN e IM ( $p = 0,017$  y  $p = 0,02$  respectivamente). Aunque se observa relación evidente entre FT1 y EG, la alta incidencia de casos con G ( - ) en los grupos FT2 y FT3 , determina la pérdida de correlación global ( $p = 0,081$ ). La significación se mantiene al relacionar el grupo FT1 con los grupos con distinto número de G ( + ) . Estos resultados demuestran relativo valor discriminante independiente, a los factores que constituyen el GH en relación a los casos con G ( + ) (12,29,30,40,124,136).

### **Correlación entre los factores pronósticos morfológicos y la expresión inmunohistoquímica.**

El escaso número de casos con expresión débil y moderada de RE (6 y 3 respectivamente) determina su escasa representatividad estadística por lo que los integraremos en el grupo de casos RE ( + ) al establecer la correlación con otros parámetros.

Se ha relacionado la expresión de RE con un crecimiento lento del tumor (43). No hemos obtenido diferencias significativas entre los casos con RE ( + ) y RE ( - ) al correlacionarlos con el TT ( $p = 0,636$ ). Sin embargo la serie de casos con RE ( + ) se correlaciona con un TTM menor que el obtenido en la serie RE ( - ). Al correlacionar la expresión de RE con los tres parámetros del GH hemos obtenido correlación estadísticamente significativa con el GN ( $p = 0,002$ ) y con el IM ( $p = 0,003$ ) pero no con la FT ( $p = 0,054$ ). Asimismo hemos obtenido una correlación altamente significativa entre la diferente expresión de RE y el GH ( $p = 0,000$ ) coincidente con otros autores (83,117,175).

No se ha establecido correlación entre expresión de RE y estatus ganglionar (43,175). Nuestros resultados muestran diferencias significativas ( $p = 0,018$ ) entre la expresión de RE y el EG. Esta diferencia se mantiene cuando se establece la relación con el grupo de casos con más de 4 G ( + ) pero se pierde con el grupo de menos de 4 G ( + ).

La correlación entre TT, TTM y expresión de p53 es contradictoria y sin relevancia estadística ( $p = 0,238$ ). No hemos obtenido correlación estadísticamente significativa con ninguno de los parámetros que integran el GH (FT, GN e IM) ( $p = 0,159$ ,  $p = 0,223$  y  $p = 0,659$  respectivamente). Tampoco existe correlación con el GH ( $p = 0,373$ ) ni con el EG ( $p = 0,92$ ). Nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores (47).

Hemos obtenido un reparto lógico de casos con distinto TT en las series con diferente expresión de c-erb2 y una correspondencia con el TTM que sin embargo no muestra significación estadística ( $p = 0,06$ ). La literatura no refiere correlación entre estos factores (47). La correlación con los parámetros del GH muestra diferencia significativa entre la FT y la expresión de c-erb2 ( $p = 0,017$ ) pero no con el GN ( $p = 0,141$ ) ni con el IM ( $p = 0,316$ ). Se ha obtenido resultados contradictorios en la correlación entre GH y expresión de c-erb2 (47,152). En nuestro estudio hemos obtenido diferencia significativa ( $p = 0,004$ ). No se ha obtenido correlación significativa entre la diferente expresión de c-erb2 y el EG.

### **Correlación entre DV y factores pronósticos morfológicos**

A pesar de la variabilidad individual y de su heterogeneidad en cada tumor, la DV parece definirse como un factor pronóstico importante (2,47,71,183) cuya utilidad ha sido valorada en distintos órganos y demostrada en el cáncer mamario y prostático (142).

Varios autores niegan relación entre TT y DV (69,116,126,133,147,178). La correlación significativa entre TT y DV establecida por otros (59,183) es coincidente con nuestros resultados ( $p = 0,025$ ). Esta se mantiene cuando se establecen intervalos en el recuento vascular ( $p = 0,01$ ).

En nuestro estudio se aprecia correlación significativa entre la DV obtenida en los diferentes grupos de FT ( $p = 0,002$ ) que se mantiene al establecer intervalos en el recuento vascular ( $p = 0,01$ ).

La relación es especialmente significativa cuando se comparan las DV obtenidas en el grupo FT1 con los restantes, siendo los valores similares al comparar el grupo FT2 y FT3.

La DV está claramente relacionada con el IM establecido tanto histológica como inmunohistoquímicamente (47).

Las diferencias son significativas entre la DV encontrada en los diferentes grupos de GN

( $p = 0,000$ ) y se mantienen al relacionar entre sí los diferentes grupos.

Los resultados obtenidos en relación al GN son superponibles a los observados en la

correlación entre DV e IM y por lo tanto con idéntica significación estadística ( $p = 0,000$ ). La correlación entre DV y ambos parámetros mantiene su alta significación estadística ( $p = 0,000$  y  $p = 0,000$  respectivamente) cuando se establecen intervalos en el recuento vascular. No hemos encontrado en la literatura referencias a la relación entre FT y GN con la DV. .

La correlación entre GH Y DV obtenida por nosotros es altamente significativa desde el punto de vista estadístico ( $p = 0,000$ ) y se mantiene cuando se establecen intervalos en el recuento vascular ( $p = 0,000$ ). Algunos autores sólo encuentran correlación entre la DV y este parámetro, pero no con otros factores pronósticos (169). En análisis de supervivencia con multivariantes, la DV supera en valor predictivo al TT, IM y EG (36). Otros autores sin embargo niegan la correlación de la DV con cualquiera de los factores pronósticos clásicos (69,116,126,133,147).

Diferentes trabajos encuentran diferencias significativas entre las DV obtenidas en pacientes sin afectación de ganglios axilares y con metástasis en los mismos (178,59,90,143). Asimismo diversos autores encuentran una relación directa entre la DV obtenida en las áreas de mayor densidad vascular del tumor ("puntos calientes") y el riesgo de metástasis ganglionar (121,161,177,178) y algunos encuentran relación entre la DV y el número de ganglios afectados (99). Otros sin embargo discrepan de estos resultados (69,116,126,133,147).

Nuestro estudio encuentra diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,000$ ) entre las DV obtenidas en las series con diferente EG. Estas diferencias se mantienen cuando se establece la comparación entre la DV de la serie con



G ( - ) y los grupos con diferente número de G ( + ). Asimismo las diferencias se mantienen al aplicar intervalos al recuento de vasos ( $p = 0,000$ ).

En el análisis de la DV por intervalos hemos observado un aumento progresivo del número de casos con G ( + ) paralelo al aumento de la DV. De forma similar el número de pacientes con G ( - ) disminuye en razón inversa al aumento de la DV. En ambos casos el cambio de tendencia se establece de forma significativa a partir de los 40 vasos. Estos hallazgos son coincidentes con los de otros autores con diferente DV (59,90,143,178). Aplicando este punto de corte al resto de parámetros correlacionados con la DV hemos comprobado que se mantiene la correlación previamente establecida entre ellos. Esta correlación no es obtenida por otros autores en relación al TT ni al GH (178).

### **Correlación entre DV y expresión inmunohistoquímica:**

La DV ha sido ligeramente mayor en la serie de casos con RE ( - ) que la obtenida en la serie con RE ( + ). Sin embargo la diferencia no llega a ser significativa ( $p = 0,058$ ) y la falta de correlación aumenta cuando se establecen intervalos en el recuento vascular ( $p = 0,485$ ). Estos resultados coinciden con los de otros autores (183).

Algunos autores niegan valor pronóstico a la sobreexpresión de p53 (47) y otros defienden su valor predictivo independiente de supervivencia (81,185,109), incrementado cuando se asocia a la sobreexpresión del factor vascular del factor de crecimiento endotelial (VEFG), un factor proangiogénico (109).

La alteración de p53 provoca la pérdida de regulación de la trombospondina-1, un potente inhibidor de la angiogénesis y un incremento en la expresión de VEFG (109). Ambos hechos sugieren un aumento de la actividad angiogénica relacionada con la mutación de p53. Las DV obtenidas en las series con distinta expresión de p53 en nuestro estudio no muestran diferencias significativas ( $p = 0,568$ ) que permitan corroborar esta hipótesis. La similitud de las DV obtenidas en ambas series se mantiene cuando se aplican intervalos vasculares en su determinación ( $p = 0,596$ ). Otros por el contrario relacionan menor DV con expresión de p53 (126).

Tampoco hemos obtenido diferencias significativas entre las DV obtenidas en las series con diferente expresión de c-erb2 ( $p = 0,778$ ) y estos resultados se mantienen cuando aplicamos intervalos al recuento vascular ( $p = 0,585$ ). Sin

embargo otros autores encuentran una relación significativa entre una DV alta y una expresión positiva de c-erb2 modulada por la maspina, un factor relacionado con la migración celular, apoptosis y angiogenesis en el cáncer mamario (152). Aplicando el mismo punto de corte en el recuento vascular que el establecido en la correlación con parámetros morfológicos, obtenemos unos resultados invariables en cuanto a su significación estadística.

## **CONCLUSIONES**

- 1) Existe relación, aunque no estadísticamente significativa, entre diferenciación y tamaño tumoral. La correlación independiente entre los

factores que integran el grado histológico combinado y el tamaño tumoral sólo es estadísticamente significativa con el índice mitótico. Cuando la correlación se establece entre dichos parámetros y el tamaño tumoral medio es significativa además con el grado nuclear. Asimismo hemos obtenido correlación con significación estadística entre el tamaño tumoral y el tamaño tumoral medio con el estatus ganglionar axilar y el grado histológico combinado.

- 2) La correlación independiente entre los factores integrantes del grado histológico combinado y éste es altamente significativa. Dicha correlación se mantiene con el estatus ganglionar axilar y entre éste y el grado histológico combinado. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas cuando la correlación se establece con los grupos con diferente número de ganglios axilares metastáticos.
- 3) La mayor incidencia de casos con expresión de receptores estrogénicos se produce en la serie con menor tamaño tumoral. Sin embargo no es estadísticamente significativa. La correlación entre grado histológico y expresión de receptores estrogénicos es altamente significativa, manteniéndose de forma independiente con el grado nuclear y el índice mitótico, pero no con la diferenciación tubular. Asimismo la correlación es significativa con el estatus ganglionar axilar.
- 4) No se ha obtenido correlación significativa entre la expresión de p53 y los diversos factores pronósticos.
- 5) La incidencia de casos con expresión de c-erb2 ha sido mayor en la serie de casos con mayor tamaño tumoral, pero no estadísticamente significativa. La correlación con el grado histológico combinado es significativa pero no la establecida de forma independiente con sus factores ni con el estatus ganglionar axilar.
- 6) El método más sensible y específico para determinar la densidad vascular, ha sido el recuento vascular a 400 aumentos, sobre el mejor

“punto caliente“, localizado previamente mediante la observación a 100 aumentos en secciones histológicas con inmunotinción para CD31.

- 7) La densidad vascular se correlaciona con alta significación estadística con el tamaño tumoral y tamaño tumoral medio, con cada uno de los parámetros que integran el grado histológico combinado, con dicho grado histológico, con el estatus ganglionar axilar y con el número de ganglios afectados.
- 8) El análisis de la densidad vascular por intervalos establece un incremento paralelo de la densidad vascular con el número de casos con metástasis ganglionar axilar así como una disminución progresiva del número de casos con ganglios axilares no afectados. Dicho análisis establece un cambio de tendencia significativo a partir de una densidad vascular de 40 vasos. Conforme aumenta la densidad vascular aumenta el número de tumores con metástasis, que alcanzan prácticamente el 100% de los casos a partir de una densidad vascular de 80 vasos. Densidades vasculares por debajo de 40 vasos conllevan un riesgo global de metástasis del 20%.
- 9) La serie de casos sin expresión de receptores estrogénicos muestra una densidad vascular ligeramente más elevada que el grupo de tumores que sí los expresa. Sin embargo las diferencias entre ambas series no son estadísticamente significativas. No hemos obtenido diferencias significativas en las densidades vasculares relacionadas con la expresión o no de p53 y c-erb2.
- 10) La densidad vascular es un dato objetivo que, unido al resto de factores pronósticos, podría señalar subgrupos de pacientes con mayor riesgo de metástasis ganglionar axilar, posiblemente tributarias de un tratamiento adyuvante o un control más severo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Abner A, Collins L, Peiro G y cols: Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83, 2502 – 2508.
2. Ahlgren J, Risberg B, Villman K y cols: Angiogenesis in invasive breast carcinoma. A prospective study of tumor heterogeneity. *Eur J Cancer* 2002; 38, 64 – 69.
3. Alanen K, Deng D, Chakrabarti S: Augmented expresión of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin B receptor in breast carcinoma. *Histopathology* 2000; 36, 161 – 167.
4. Albertini L, Lyman G, Cox C y cols. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patients with breast carcinoma. *JAMA* 1996; 272, 1818 – 1822.
5. Allred D, Elledge R. Caution concerning micrometastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes. *Cancer* 1999; 86, 905 – 907.
6. Anderson E: The use of steroid receptors in predicting response to hormonal therapy. *Pronostic and predictive factors in breast cancer*, 135 – 146. Walter R. Edit. London 2003.
7. Anderson B, Petreck J, Byrd D y cols. Pregnancy influences breast cancer stage at diagnosis in women 30 years of age and younger. *Ann Surg Oncol* 1996; 3, 204 – 211.
8. Aonuma M, Saeki Y, Akimoto T y cols. Vascular endothelial growth factor overproduced by tumor cells acts predominantly as a potent angiogenic factor contributing to malignant progression. *Int J Exp Pathol* 1999; 80, 271 – 281.

9. Arora R, Joshi K, Nijhawan R y cols. Angiogenesis as an independent prognostic indicator in node-negative breast cancer. *Analyt Quant Cytol Histol* 2002; 24, 228 – 233.
10. Ausprunk D, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14, 53 – 65.
11. Azzopardi J. Problems in breast pathology. Classification of primary breast carcinoma. Azzopardi J Edit. WB Saunders. London 1979.
12. Baak J, Van Dop H, Kurver P. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56, 374 – 382.
13. Baak J. Mitosis counting in tumors. *Human Pathol.* 1990; 21, 683 - 685.
14. Barbareschi M, Weidner N, Gasparini C y cols. Microvessel density quantification in breast carcinoma. *Appl Immunohistoch* 1995; 375 – 84.
15. Bar – Eli M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis in human melanoma. *Pathobiology* 1999; 67, 3 – 18.
16. Beliën J, Somi S, De Jong J y cols. Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 1999; 52, 184 – 192.
17. Ben-Barcuch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res* 2002; 5, 31 – 36.
18. Berguin I, Sloane B. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* 1996; 339, 281 – 294.

19. Black M, Barclay T, Hankey B. Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer* 1975; 36, 2048 – 2055.
20. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11, 359 – 377.
21. Bossari S, Lee A, De Lellis R y cols. Microvessels quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992; 23, 755 – 761.
22. Brown J, Benson E, Jones M. Confirmation of a long-term prognostic index in breast cancer. *Breast* 1993; 2, 144 – 147.
23. Brushan M, Young H, Brenchley P y cols. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002; 147, 418 – 425.
24. Callagy G, Dimitriadis E, Hermeijer J y cols. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer: a more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8, 104 – 109.
25. Cameron I, Short N, Sun L y cols. Endothelial cell pseudopods and angiogenesis of breast cancer tumors. *Cancer Cell Int* 2005; 5, 17.
26. Champion H, Wallace I, Prescott T. Histology in breast cancer prognosis. *Br J Cancer* 1972; 26, 129 – 138.
27. Chelouche-Lev D, Miller C, Tellez C y cols. Different signalling pathways regulate VEGF and IL-8 expression in breast cancer: implications for therapy. *Eur J Cancer* 2004; 40, 2509 – 2518.
28. Chen Y, Schnitt S. Prognostic factors for patients with breast cancers 1 cm and smaller. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51, 209 – 225.



29. Clayton F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node negative infiltrating ductal breast carcinomas. Mitotic count is the best single predictor. *Cancer* 1991; 68, 1309-1317.
30. Clayton F, Hopkins C. Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas. *Cancer* 1993; 71, 1780 – 1790.
31. Colpaert C, Vermeulen P, Benoy I y cols. Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. *Br J Cancer* 2003; 88, 718 – 725.
32. Connor A, Pinder S, Elston C y cols. Intratumoral heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB-1 antibody. *Breast* 1997; 6, 171 – 176.
33. Cross S. Grading and scoring in histopathology. *Histopathology* 1998; 11, 99 – 106.
34. Cruz D, Valenti C, Díaz A y cols. Microvessel density counting in breast cancer: slide versus digital images. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23, 15 – 20.
35. Davis B, Gelber R, Doldhirchs A y cols. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Human Pathol* 1985; 16, 1212 – 1218.
36. De Jong J, Van Diese P, Baak J. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology* 2000; 36, 306 – 312.
37. De Mascarell I, Bonichon F, Coindre J y cols. Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two

- special techniques: reevaluation with longer follow-up. *Br J Cancer* 1992; 66, 523 – 527.
38. Delisser H, Christofidou – Solomidou M, Sprieter R y cols. Involvement of endothelial PECAM 1 / CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151, 671 – 677.
39. Diab S, Clark G, Osborne C y cols. Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1999; 17, 1442 – 1448.
40. Dunne B, Going J. Scoring nuclear pleomorphism in breast cancer. *Histopathology* 2001; 39, 259 – 265.
41. Edel M, Harvey J, Papadimitriou J. Comparison of vascularity and angiogenesis in primary invasive mammary carcinomas and in their respective axillary lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18 (8), 695 – 702.
42. Edel M, Robbins P, D-Antuono M y cols. Assesment of endotelial cell proliferation in primary breast carcinoma and its association with axillary lymph node status. *Breast* 2000;9 (1), 28 - 34.
43. Ellis I, Schnitt S, Sastre-Garau X y cols. Invasive breast carcinoma. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* Tavassoli F & Devilee P Edts. Pag 13 – 59 .WHO. IARC Press, Lyon 2003.
44. Ellis I, Galea M, Broughton N y cols. Pathologic pronostic factors in breast cancer. II: Histologic type. Relationship with survival in a large study with long term follow-up. *Histopathology* 1992; 20, 479 – 489.

45. Elston C, Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer; experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 403 – 410.
46. Engels K, Fox S, Withehouse R y cols. Up-regulation of thymidine phospholylase expression is associated with a discrete pattern of angiogenesis in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 1997; 4, 414 – 420.
47. Erden O, Dursun A, Loskun U y cols. The pronostic value of p53 and c-erb2 expresion, proliferative activity and angiogenesis in node – negative breast carcinoma. *Tumori* 2005; 91, 46 – 52.
48. Ernster V, Barclay L, Kerlikowske K y cols. Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the population –based surveillance, epidemiology and end results program. *Arch Intern Medic* 2000; 160, 953 – 958.
49. Esserman L, Hylton N, George T y cols. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging to assess tumor histopathology and angiogenesis in breast carcinoma. *Breast* 1999; 1, 13 – 21.
50. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi A. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast : an aggressive tumour showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 1992; 23, 655 – 662.
51. Fisher E, Redmond C, Fisher B. Histologic Grading of Breast Cancer. *Pathol Ann Part I* 1980, 239 – 252.
52. Fisher B, Costantino J, Redmond C. A randomized clinical trial evaluating Tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 1989; 320, 479 – 484.

53. Fitzgibbons P, Page D, Weaver D y cols. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Concensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000; 124, 966 – 978.
54. Folkman J., Klagsbrun M.: Angiogenic factors. Science: 1987, 235, 442 – 447.
55. Folkman J, Watson K, Ingber D y cols. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature 1989; 339, 58 – 61.
56. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285, 1182 – 1186.
57. Fox S, Gatter K, Bicknell R y cols. Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. Cancer Res 1993; 18, 4161 – 4163.
58. Fox S, Leek R, Weekes M y cols. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkey count and computer image analysis. J Pathol 1995; 177, 275 – 283.
59. Fox B, Gatter K, Harris. Tumor angiogenesis. J Pathol 1996; 179, 232 – 237.
60. Fox S, Leek R, Bliss J y cols. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastasis in breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 1997; 14, 1044 – 1049.
61. Frangou E, Lawson J, Kanthan R. Angiogenesis in male breast cancer. World J Surg Oncol 2005; 3, 16.
62. Freund A, Chauveau C, Brouillet J y cols. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative estaus of breast cancer cells. Oncogene 2003; 22, 256 – 265.

63. Fridman V, Humblet C, Bonjean K y cols. Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virchows Arch* 2000; 437, 611- 617.
64. Frierson H, Wolber R, Berean K y cols. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richarson histological grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1995; 103, 195 – 199.
65. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Oncol Hematol* 2001; 37, 97 – 114.
66. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000; 1, 37 – 44.
67. Gastl G, Hermann T, Steurer M. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology* 1997; 54, 177 – 184.
68. Gilchrist K, Gould V, Hirschl S y cols. Interobserver variation in the identification of breast carcinoma in intramammary lymphatics. *Human Pathol* 1982; 13, 170 – 172.
69. Goulding H, Rashid N, Roberston J y cols. Assement of angiogenesis in breast cancer: an important factor in prognosis ?. *Human Pathol* 1995; 26, 1196 – 1200.
70. Graeber T, Osmanian C, Jacks T y cols. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379, 88 – 91.
71. Guinebretiere J. Angiogenesis and breast neoplasm. The pathologist-s point of view. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33, 140 – 146.

72. Gunningham S, Currie M, Han C y cols. VEGF - B expresión in human primary breast cancer is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. *J Pathol* 2001; 193, 325 – 332.
73. Hansen S, Grabau D, Rose C y cols. Angiogenesis in breast cancer : a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density. *Lab Invest* 1998; 78, 1563 – 1573.
74. Hansen S, Sorensen F, Vach W y cols. Microvessel density compared with Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology* 2004; 44, 428 – 436.
75. Harmey J, Bouchier – Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumor cells: implications for antiangiogenic therapy. *BioEssays* 2002; 24, 280 – 283.
76. Harvey J, Clark G, Osborne C y cols. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17, 1474 – 1481.
77. Hartveit F. Prognostic typing in breast cancer. *Br Med J* 1971; 4, 253 – 257.
78. Haybittle J, Blamey R, Elston C y cols. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45, 361 – 366.
79. Heffelfinger S, Yassin R, Miller M y cols. Vascularity of proliferative breast disease and carcinoma in situ correlates with histological features. *Clin Cancer Res* 1996; 11, 1873 – 1878.
80. Heimann R, Ferguson D, Powers C y cols. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *Br J Biomed Sci* 1998; 3, 214 – 220.

81. Heimann R, Hellman S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2000; 36, 1631 – 1639.
82. Hellmans P, Van Dam P, Weyler J y cols. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 72, 354 – 360.
83. Henderson I, Canellos G. Cancer of the breast. The past decade. *N Engl J Med* 1980; 103, 17 – 20.
84. Holmgren L, O'Reilly M, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis supression. *Nature Med* 1995; 1, 149 – 153.
85. Holland R, Hendriks J. Microcalcifications associated with ductal carcinoma in situ: mammographic-pathologic correlation. *Sem Diagn Pathol* 1994; 11, 181 – 192.
86. Horak E, Leek R, Klenk N y cols. Angiogenesis, assessed by platelet / endothelial all adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340, 1120 – 1124.
87. Hortobagyi G. Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer* 2000; 15, 3073 – 3079.
88. Huang B. Roles of main pro and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10, 467 – 470.
89. Ingber D, Madri J, Folkman J. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology* 1986; 119, 1768 – 1775.

90. Jiang X, Huang X, Li J. The correlation between tumor angiogenesis and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1997; 35, 583 – 585.
91. Kakolyris S, Fox S, Koukourakis M y cols. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br J Cancer* 2000; 82, 844 – 851.
92. Kerbel R. Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells: genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv* 1988; 7, 597 – 629.
93. Kesari A, Chellam V, Mathew B y cols. Transforming growth factor beta related to extent of tumor angiogenesis but not apoptosis or proliferation in breast carcinoma. *Breast Cancer* 1999; 25, 29 – 36.
94. Khanuja P, Fregene T, Gimotty P y cols. Angiogenesis does not predict recurrence in patients with primary breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12, 67.
95. King T, Brey E, Youssef A y cols. Quantification of vascular density using a semiautomated technique for immunostained specimens. *Analyt Quant Cytol Histol* 2002; 24, 39 – 48.
96. Kondo S, Kubota S, Shimo T. Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases. *Carcinogenesis* 2000; 23, 769 – 776.
97. Kronqvist P, Kuopio T, Collan Y. Morphometric grading of invasive ductal breast cancer. I. Thresholds for nuclear grade. *Br J Cancer* 1998; 78, 800 – 805.



98. Kucera E, Speiser P, Gnant M y cols. Prognostic significance of mutation in the p53 gene, particularly in the zinc-binding domains, in lymph node- and steroid receptor positive breast cancer patient. Austrian Breast Cancer Study Group. *Eur J Cancer* 1999; 35, 398 – 405.
99. Laforga J, Aranda F. Angiogenic index: a new method for assessing microvasculature in breast carcinoma with possible prognostic implications. *Breast J* 2000; 6, 103 – 107.
100. Lakhani S, Jacquemier J, Sloane J y cols. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancer involving BRCA1 and BCRA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90, 1138 – 1145.
101. Lamy P, Pujol P Thezanas S y cols. Progesterone receptors quantification as a strong prognostic determinat in post menopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76, 65 – 71.
102. Leaker R, Barnes D, Pinder S y cols. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer: a working protocol. *J Clin Pathol* 2000; 53, 634 – 635.
103. Lee J, Kim H Jung J y cols. Correlation between angiogenesis, apoptosis and cell proliferation in invasive ductal carcinoma of the breast and their relation to tumor behavior. *Analyt Quant Cytol Histol* 2001; 23, 161 – 168.
104. Leong A, Cooper K, Leong F. CD31. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology*. Greenwich Medical Media Ltd Ed. London. 2002, 81-82.

105. Leitner S, Swern A, Weinberger D y cols. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer* 1995; 76, 2266 – 2274.
106. Liberman L. Pathologic analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma. *Cancer* 2000; 88, 971 – 977.
107. Lin Y, Huang R, Chen L y cols. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. In *J Cancer* 2004; 109, 507 – 515.
108. Lin Y, Wang S , Huang B. Angiogenic effect of interleukin-8 in breast cancer and its association with estrogen receptor. *Zonghua Zhong Lin Za Zhi* 2005; 85, 1419 - 1423.
109. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B y cols. p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 89, 51 – 62.
110. Liotta L, Kleinerman J, Saidel G. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976; 36, 889 – 894.
111. Logasundaran R, Joshi K, Bhalla V y cols. Correlation between VEGF expression and angiogenesis in breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2004; 26, 105 – 108.
112. López–Aberde G, Pollán M, Aragonés N y cols. Situación del Cáncer en España: Incidencia. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Plan Integral del Cáncer: Situación del Cáncer en España. Ministerio de Salud y Consumo. Madrid 2004.
113. Magennis D. Angiogenesis: a new prognostic marker for breast cancer. *Br J Biomed Sci* 1998; 3, 214 – 220.

114. Mansour E, Ravdin P, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994; 74, 381 – 400.
115. Martin L, Holcombe C, Green B y cols. Is a histological section representative of whole tumour vascularity in breast cancer ?. *Br J Cancer* 1997; 1, 40 – 43.
116. Mayer M, Seshadri R, Raymond W y cols. Tumor microvascularity has no independent prognostic significance for breast cancer. *Pathology* 1998; 2, 105 - 110.
117. McGuire W, Tandon A, Allred D y cols. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82, 1006 – 1015.
118. Monschke F, Muller W, Streffer C. Cell proliferation and vascularization in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1991; 49, 812 – 815.
119. Naccarato A, Viacava P, Bocci G y cols. Definition of the microvascular pattern of the normal adult mammary gland . *J Anat* 2003; 599 - 603.
120. Nixon A, Neuberg D, Hayes D y cols. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 888 - 894.
121. Ogawa Y, Chung Y, Nakata B y cols. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer* 1995; 72, 1297 – 1301.
122. Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K y cols. Frequent overexpression of the ciclina D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1998; 58, 2876 – 2880.

123. Page D, Anderson T How should we categorize breast cancer ?. *Breast* 1993; 2, 217 – 219.
124. Parl F, Dupont W. A retrospective cohort study of histologic risk factors in breast cancer patients. *Cancer* 1982; 50, 2410 – 2416.
125. Parums D, Cordell J, Micklem K y cols. A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissues sections. *J Clin Pathol* 1990; 43, 572 -577.
126. Pendleton N, Pazouki S, Heerkense E y cols. Relationship between different measurements of vascularity and clinico-pathological parameters in breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 68, 4565 - 4568.
127. Pluda J. Tumor – associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications and therapeutic strategies. *Sem Oncol* 1997; 24, 203 – 214.
128. Price D, Miralem T, Jiang S y cols. Role of vascular endothelial growth factor in stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12, 129 – 135.
129. Quinn M, Martínez García C, Bazina F. Variations in survival from breast cancer in Europe by age and country (1978 – 1989). *Eur J Cancer* 1998; 34, 2204 – 2211.
130. Rajesh L, Joshi K, Bhalla V y cols. Correlation between VEGF expression and angiogenesis in breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2004; 26, 105 – 108.
131. Ramírez Fernández R, Bosch José X. Evolución de la mortalidad por cáncer en Andalucía (1975 – 1985). Consejería de Salud. Junta de Andalucía. Sevilla 1992.

132. Rak J, Filmus J, Kerbel R. Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells: the “angiogenic progression” hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32, 2438 – 2450.
133. Raymond J. Tumor angiogenesis inhibitors: media and scientific aspects. *Presse Med.*1998; 27, 1221 – 1224.
134. Ridolfi R, Jamenhdor M, Arber J. Her-2 / neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hibridation approach. *Mod Pathol* 2000; 13, 866 – 873.
135. Rigaud C, Theobald S, Noel P y cols. Medullary carcinoma of the breast. A multicenter study of its diagnostic consistency. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117, 1005 – 1008.
136. Robbins P, Pinder S, De Klerk N y cols. Histological grading of breast carcinomas : a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995; 26, 873 – 879.
137. Rosen P, Oberman H. Tumors of the Mammary Gland. *Atlas of Tumor Pathology. Third Series. Fascicle 7. A.F.I.P. Washington D.C. 1993*
138. Ruiz Ramos M, Viciana Fernández F. Tendencia y distribución geográfica de la mortalidad por cáncer de mama en Andalucía (1976 – 1995). *Atención Primaria* 20, 299 – 304.
139. Salcedo R, Ponce M, Young H y cols. Human endotelial cell express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000; 96, 34 – 40.
140. Santinelli A, Baccarini M, Colanzi P y cols. Microvessel quantification in intraductal and early invasive breast carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 2000; 2, 277 – 284.

141. Seidman J, Schnapper L, Aisner S. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1995; 75, 65 – 71.
142. Sharma S, Sharma M, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histopronostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46, 481 - 489.
143. Shpitz B, Bomstein Y, Stemberg A y cols. Angiogenesis, p53 and c-erb2 immunoreactivity and clinicopathological features in male breast cancer. *J Surg Oncol* 2000; 75, 252 – 257.
144. Shimo T, Nakanishi T, Nishida T y cols. Conective tissue growth factor induces the proliferation, migration and tube formation of vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *J Biochem (Tokio)*1999; 126, 137 – 145.
145. Shimo T, Kubota S, Kondo S. Conective tissue growth factor is a maior angiogenic agent that is induced by hypoxia in a human breast cancer line. *Cancer Lett* 2001; 174, 57 – 64.
146. Shweiki D, Itin A, Soffer D y cols. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia – initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359, 843 – 845.
147. Siitonen S, Haapasalo H, Rantala I y cols. Comparison of different immunohistochemical metods in the assement of angiogenesis lack of pronostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinoma. *Mod Pathol* 1995; 8, 745 - 752.
148. Silver S, Tavassoli F. Pleomorphic carcinoma of the breast: clinicopathological analysis of 26 cases of an unusual high-grade phenotype of ductal carcinoma. *Histopathology* 2000; 36, 505 – 514.

149. Simpson J, Dutt PH, Page D. Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas : a proposal. *Hum Pathol* 1992; 23, 608 – 611.
150. Simpson J. Predictive utility of the histopatologic analysis of carcinoma of the breast. *Advances in Pathol Lab Med* 1994; 7, 107 – 121.
151. Sobol H. BRCA-p53 relationship in hereditary breast cancer. *Int J Oncol* 1997; 10, 349 – 353.
152. Sopel M, Kasprzyk I, Berdowska I : Maspin and cerb2 expresion in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. *Folia Histocho Cytobiol* 2005; 43, 109 - 116.
153. Srivastava A. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate – thickness (0,76 – 4,0 mm thick) skin melanoma. *Am J Pathol* 1988; 133,419 – 423.
154. Stenkvis B, Bergtsson E, Eriksson O y cols. Histopathological systems of breast cancer classification: reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983; 36, 392 – 398.
155. Stromblad S, Cheresh D. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1996; 6, 462 – 468.
156. Stromblad S, Cheresh D. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol* 1996; 3, 881 – 885.
157. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M y cols. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57, 1043 – 1046.
158. Todd J, Dowle C, Williams M y cols. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 56, 489 – 492.

159. Thor A. Prognostic factors in breast cancer: integrating the cytology laboratory. *Diag Cytopathol* 1992; 4, 319 - 321.
160. Thor A, Berry D, Budman D y cols. Erb-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90, 1346 – 1360.
161. Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is a independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55, 371 – 374.
162. Tokes A, Hortovanyi E, Kulka J y cols. Tenascin expression and angiogenesis in breast cancers. *Pathol Res Pract* 1999; 195, 821 – 828.
163. Tsuda H, Hirohashi S. Association among p53 gene mutation, nuclear accumulation of the p53 protein and aggressive phenotypes in breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 57, 498 – 503.
164. Tough I, Carter D, Fraser J y cols. Histological grading in breast cancer. *Br J Cancer* 1969; 23, 294 – 301.
165. Urh J, Schenermann R, Steet N y cols. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nature Med* 1997; 505 – 509.
166. Van der Laak J, Wetphal J, Schalkwijk L y cols. An improved procedure to quantify tumour vascularity using true colour image analysis. Comparison with the manual hot spot procedure in a human melanoma xenograf model. *J Pathol* 1998; 184, 136 – 143.
167. Van Diest P, Baak J. The Morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node–negative and lymph node-positive breast cancer patients. *Hum Pathol* 1991; 22, 326 – 330.



168. Van Diest P, Baak J, Matze-Cok P y cols. Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol* 1992; 23, 603 – 607.
169. Van Hoef M, Knox W, Dhesi S y cols. Assesment of tumor vascularity as prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 8, 1141 - 1145.
170. Vartanian R, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 1444, 1188 – 1194.
171. Vermeulen P, Gasparini G, Fox S y cols. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A, 2474 – 2484.
172. Vermeulen P, Libura M, Libura J y cols. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 42, 165 – 172.
173. Veronesi U, Galimberti V, Zurrada S y cols. Pronostic significance of number and level of axillary nodal metastasis in breast cancer. *Breast* 1993; 2, 224 – 228.
174. Veronesi U, Boyle P, Goldhirchs A y cols. Breast cancer. *Lancet* 2005; 365,1727 – 1741.
175. Visscher D, Sarkar F, Crissman J. Clinical significance of pathologic, cytometric and molecular parameters in carcinoma of the breast. *Advances Pathol Lab Med* 1992; 5, 123 – 161.

176. Vogel C, Cobleigh M, Tripathy D y cols. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of Her-2 overexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2002; 20,719 – 726.
177. Weidner N, Semple J, Welch W y cols. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324, 1 – 8.
178. Weidner N. The relationship of tumor angiogenesis and metastasis with emphasis on invasive breast carcinoma. Adv Pathol Lab Med 1992; 5, 101 – 121.
179. Weidner N, Moore D, Vartanian R. Correlation of ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel parafin reactive M1B1 antibody. Human Pathol 1994; 25, 337 – 342.
180. Weidner N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. J Pathol 1998; 2, 130 – 135.
181. Wolf B. Histological grading in carcinoma of breast. Br J Cancer 1966; 20, 36 – 40.
182. Wood D, Vousden K. Regulation of p53 function. Exp Cell Res 2001; 264, 56 – 66.
183. Xiao J, Yu X, Xu X y cols. Relation between angiogenesis, fibrinolysis and invasion i metastasis in breast cancer. Zonghua Zhong Lin Za Zhi 2005; 27, 226 -228.

184. Zheng W., Zhan R.: Quantitative comparison of apoptosis to cell proliferation and p53 protein in breast carcinomas. *Analyt.Quant.Cytol.Histol.*: 1998, 20, 1 – 6.
185. Zolota V., Gerokosta A., Melachrinou M. y cols. Microvessel density, proliferating activity, p53 and bcl-2 expression in in situ ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res.*: 1999, 19, 3269 – 3274.

Gráfico nº 1

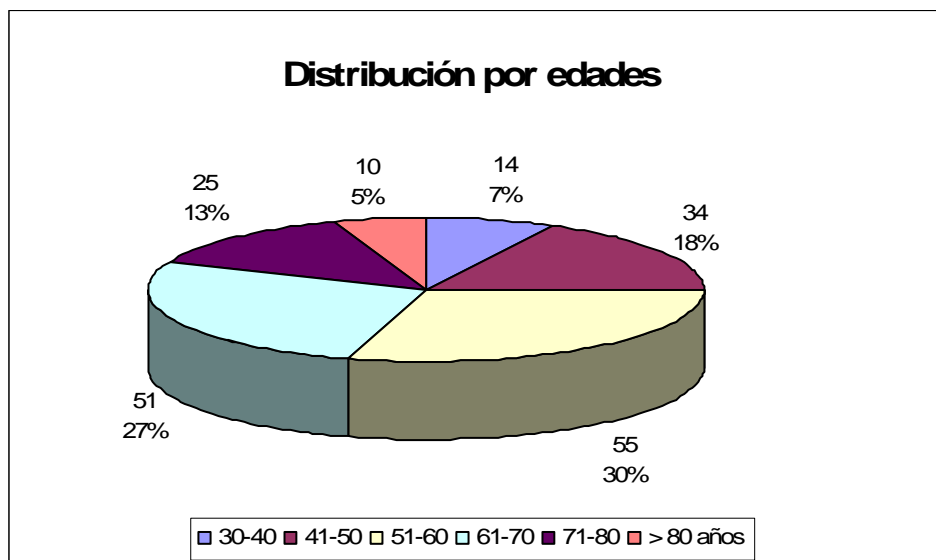
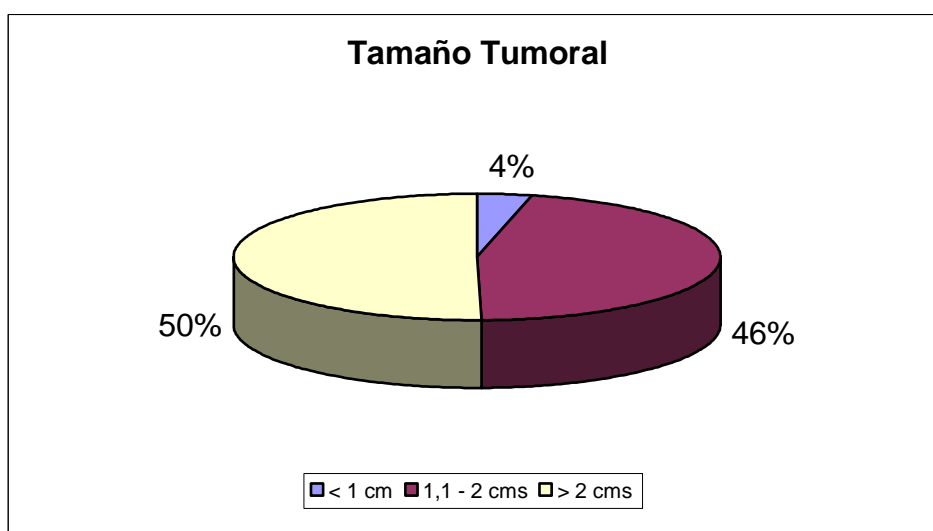
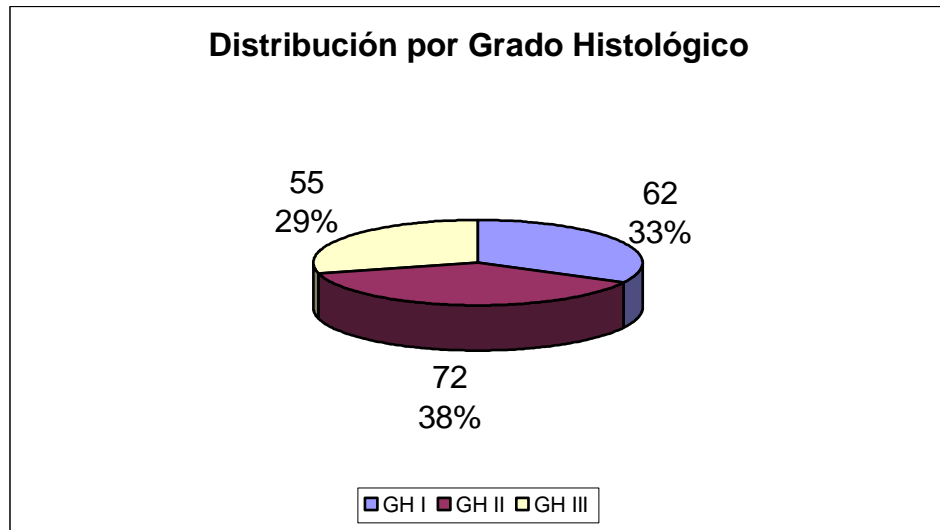


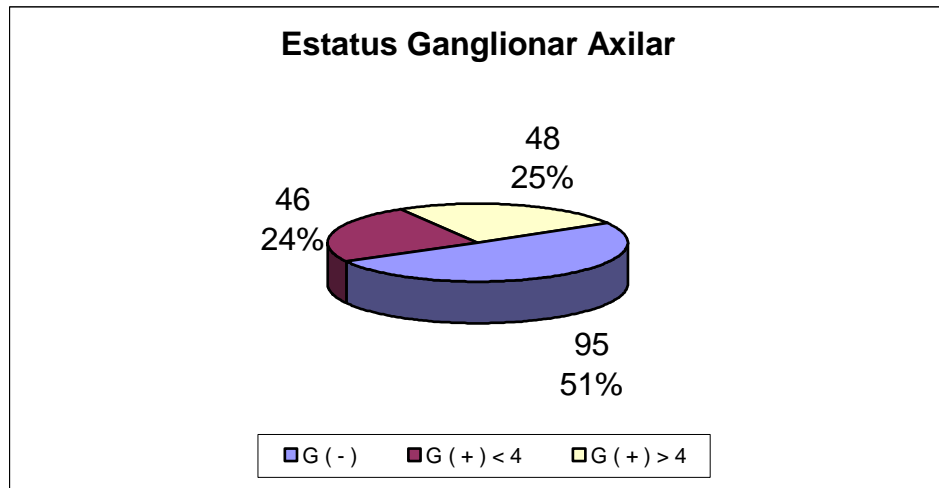
Gráfico nº 2



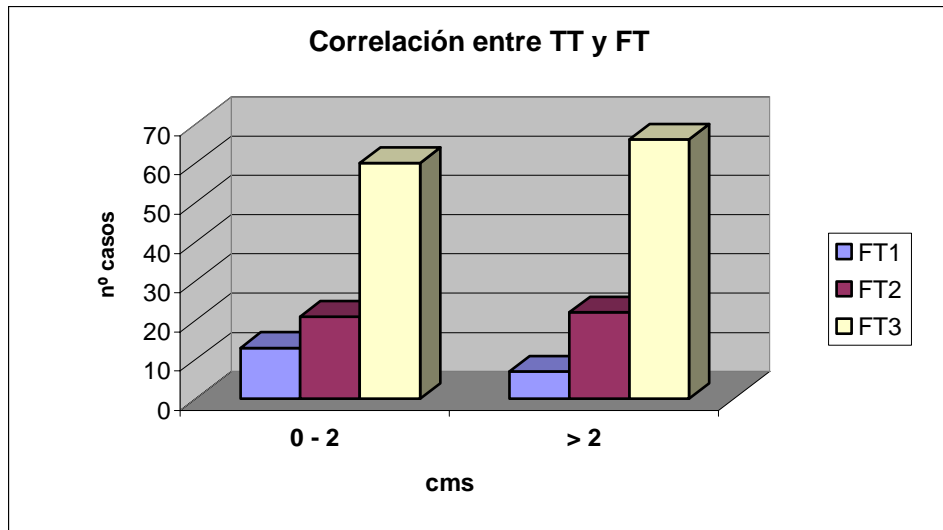
**Gráfico n° 3**



**Gráfico n° 4**



**Gráfico n° 5**



**Gráfico n° 6**

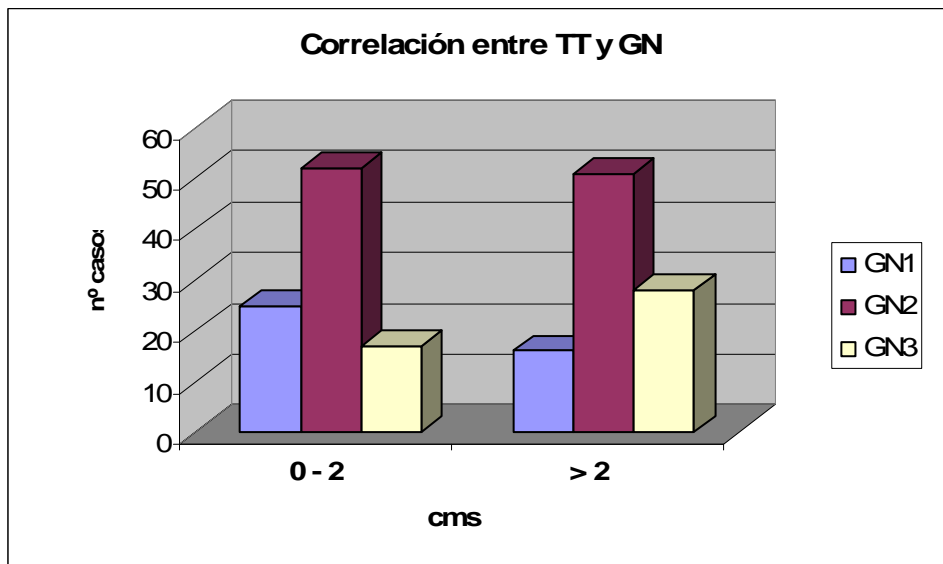


Gráfico nº 7

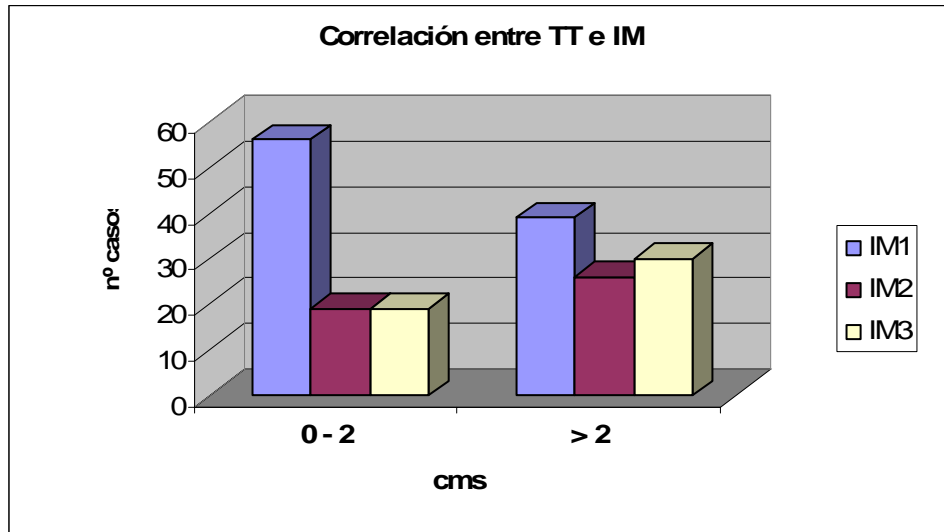
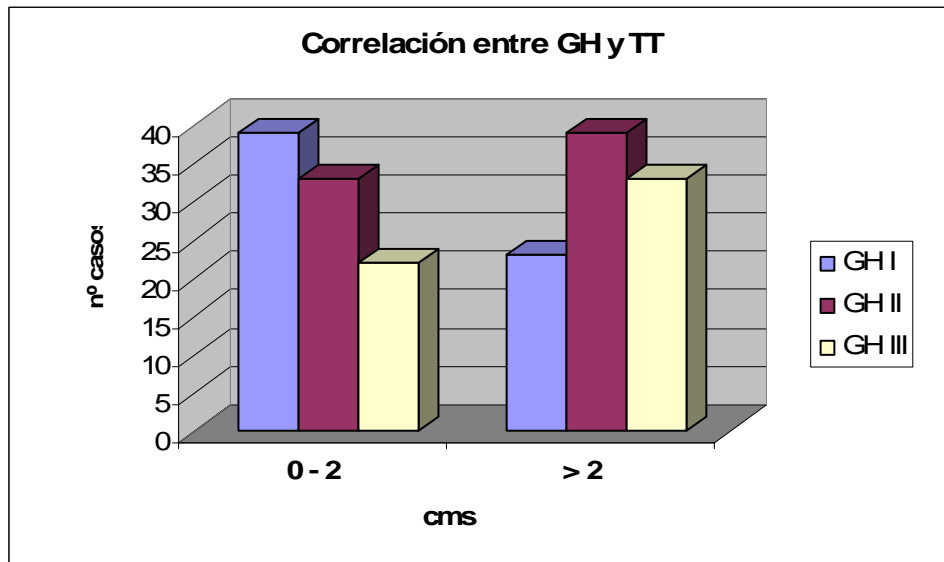
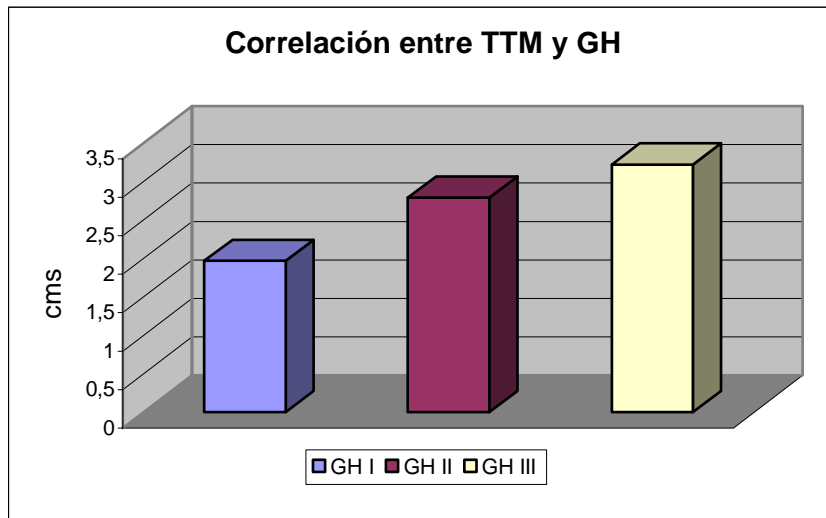


Gráfico nº 8



**Gráfico nº 9**



**Gráfico nº 10**

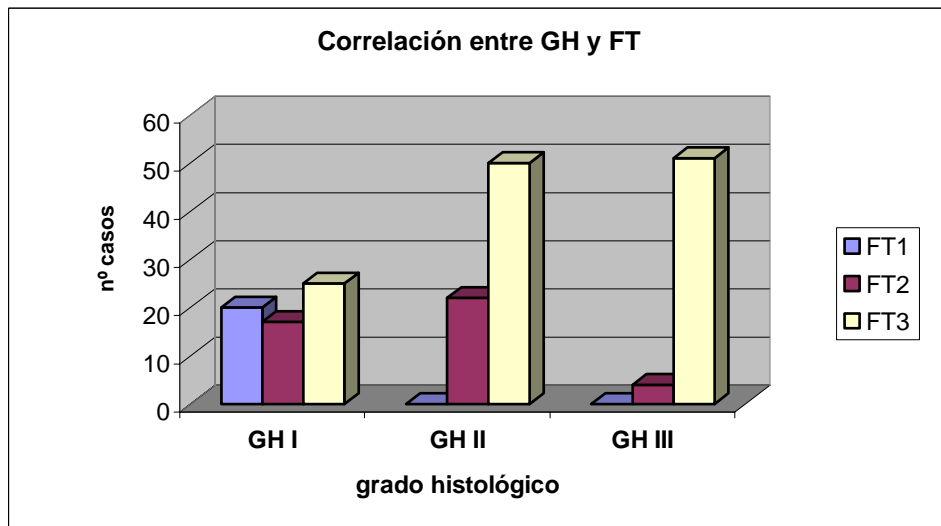




Gráfico nº 11

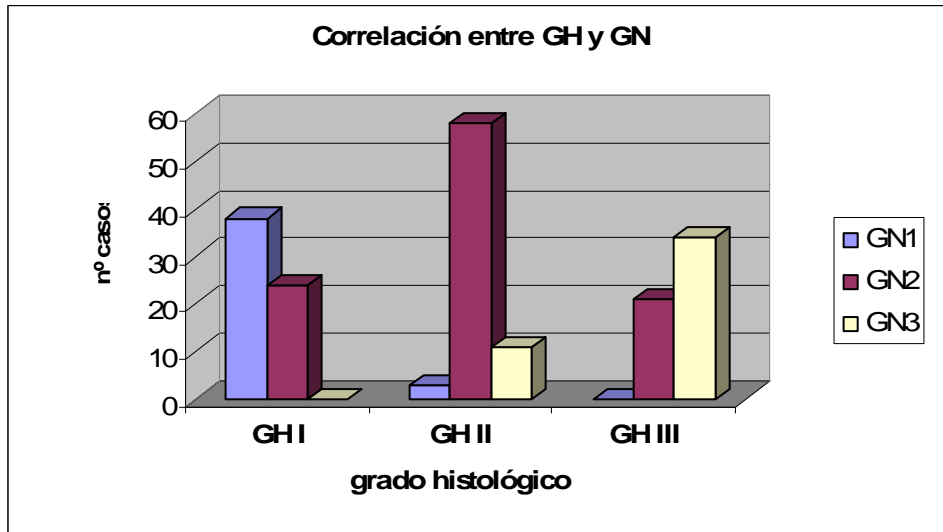
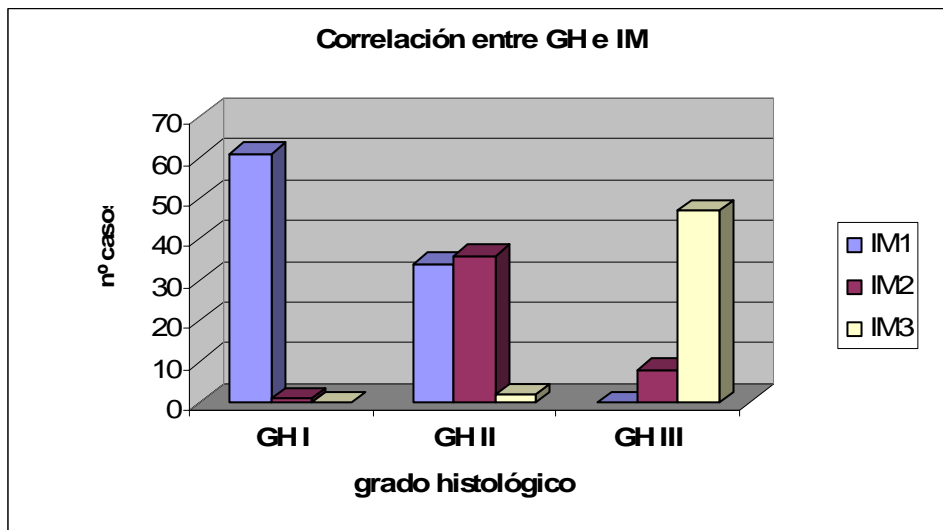
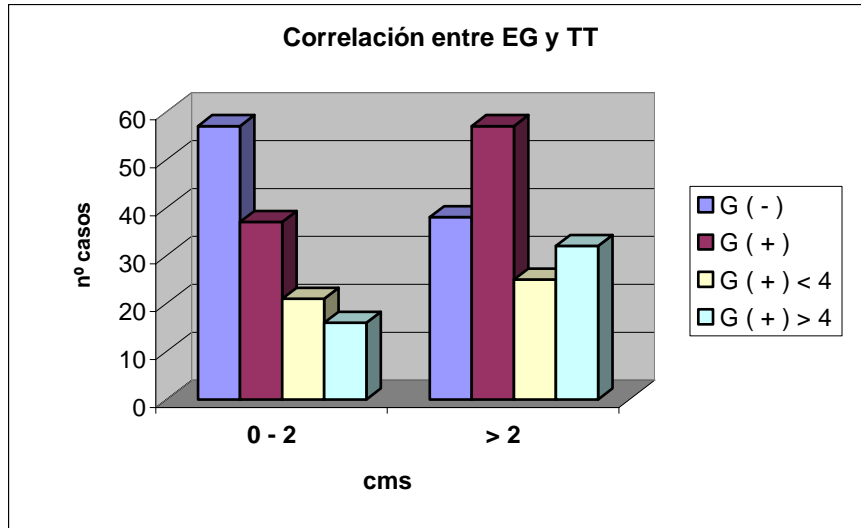


Gráfico nº 12



**Gráfico n° 13**



**Gráfico n° 14**

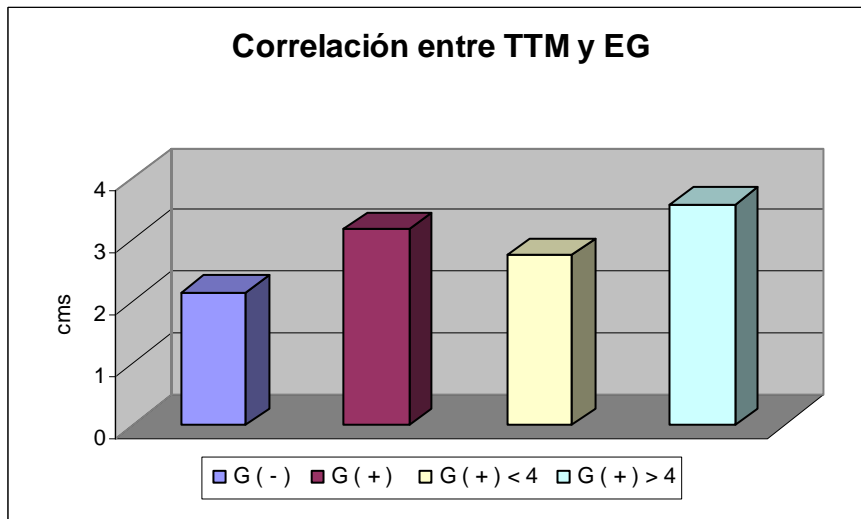


Gráfico nº 15

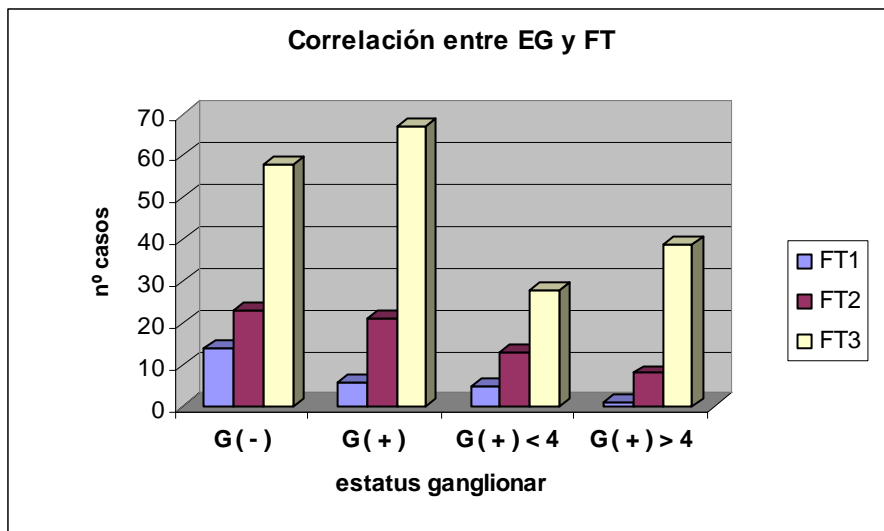
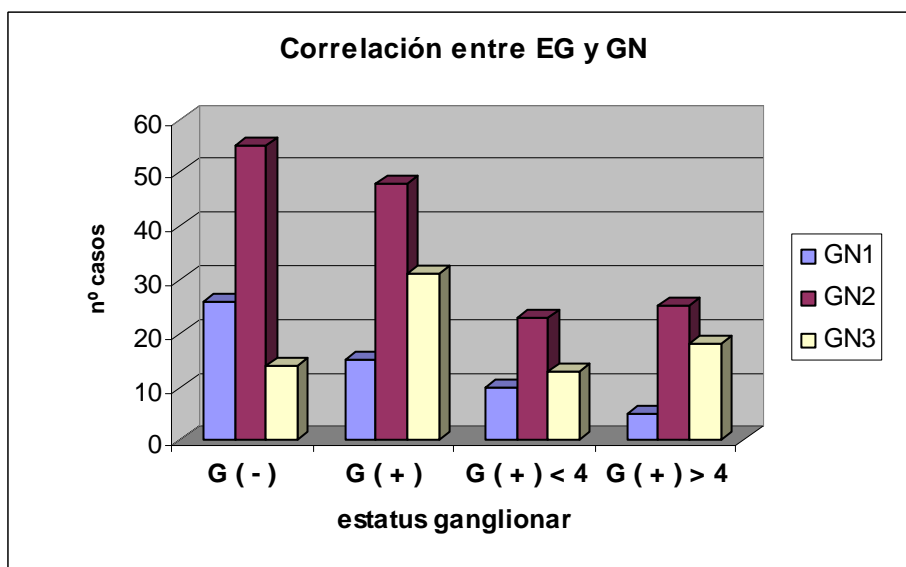
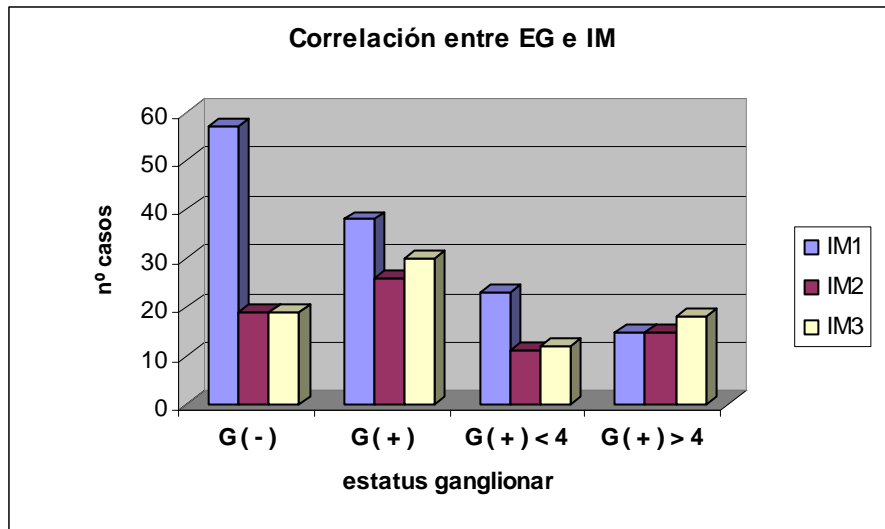


Gráfico nº 16



**Gráfico n° 17**



**Gráfico n° 18**

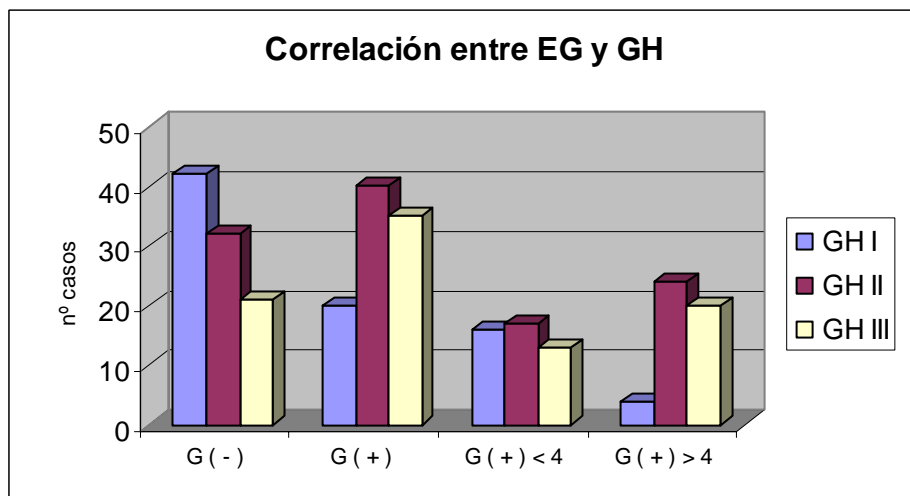


Gráfico n° 19

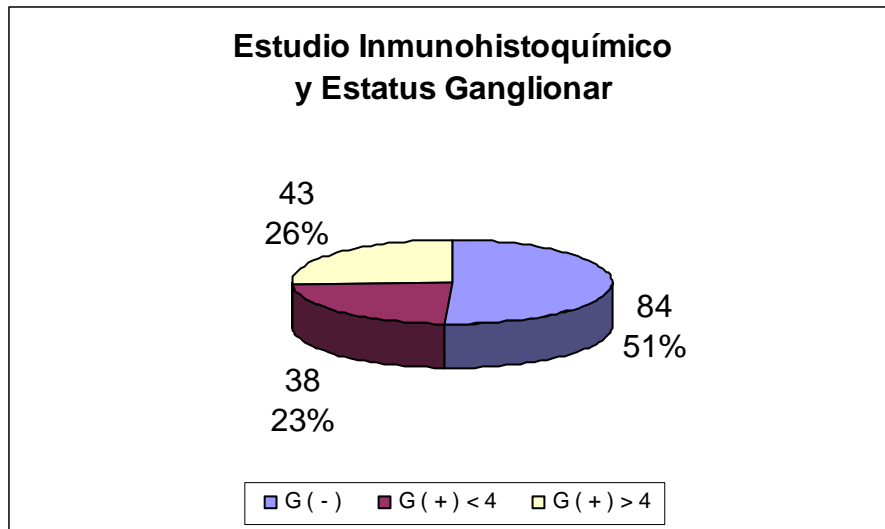


Gráfico n° 20

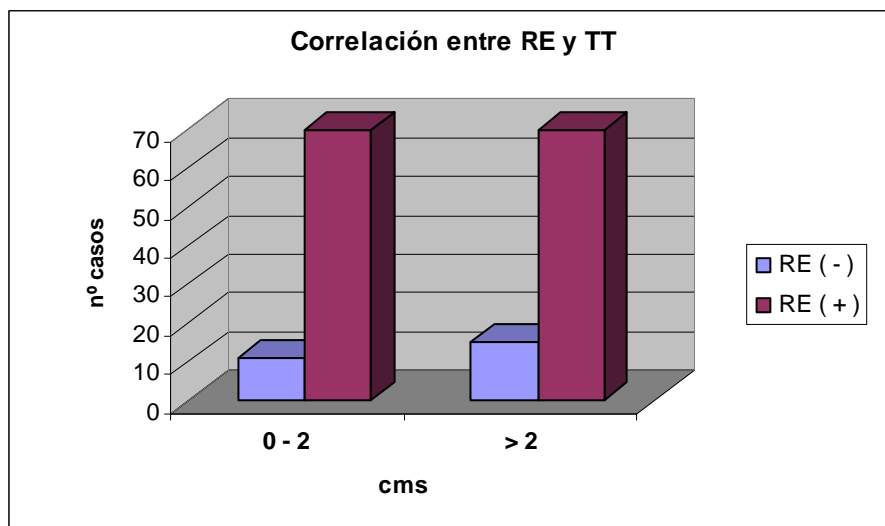


Gráfico n° 21

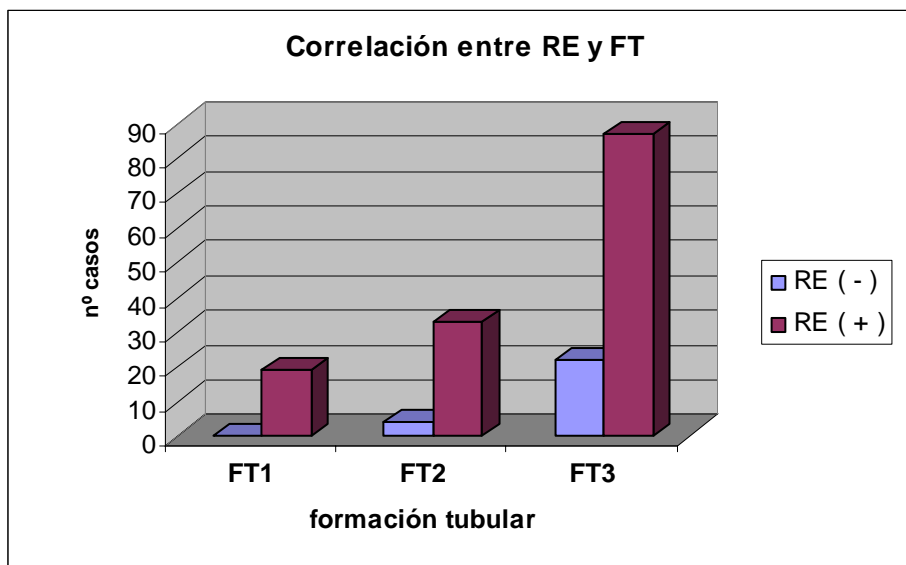


Gráfico n° 22

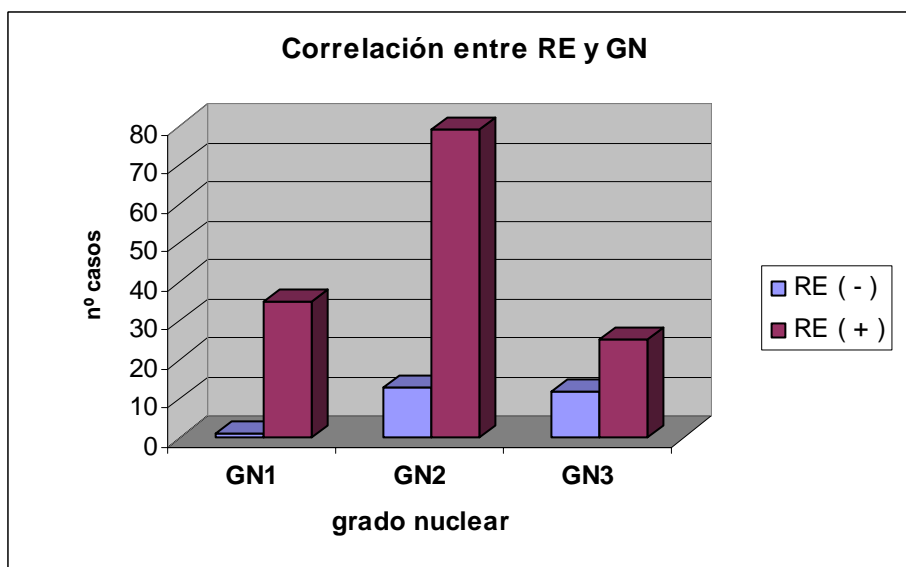


Gráfico nº 23

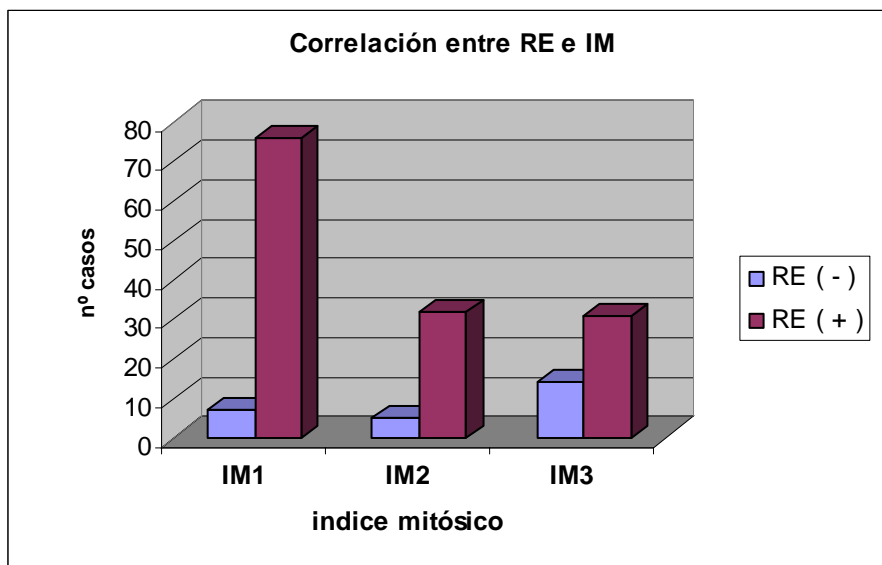


Gráfico nº 24

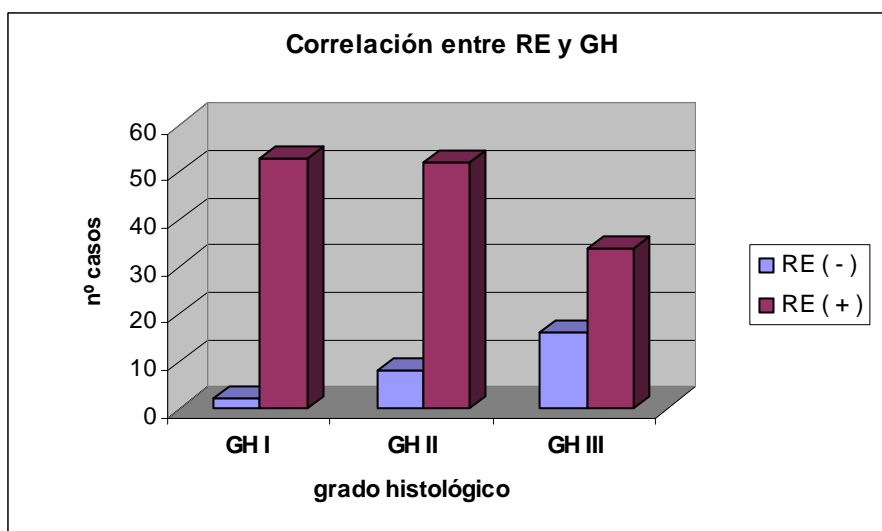


Gráfico n° 25

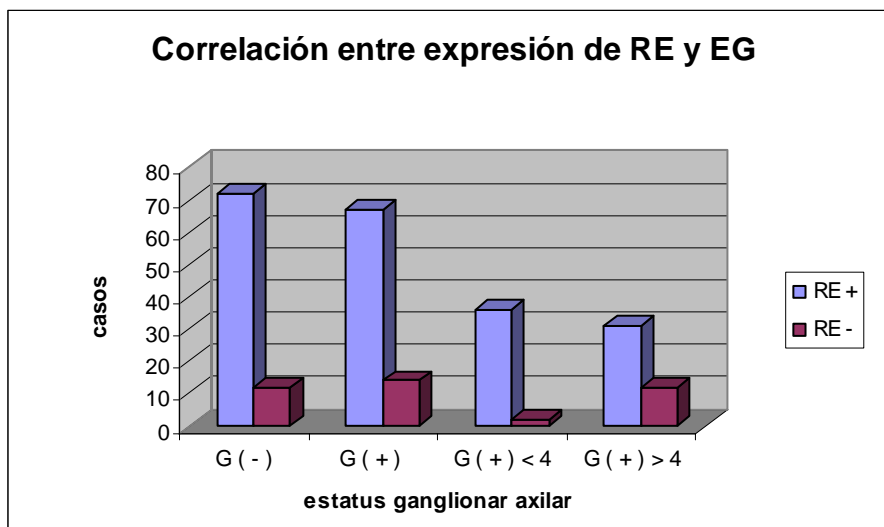
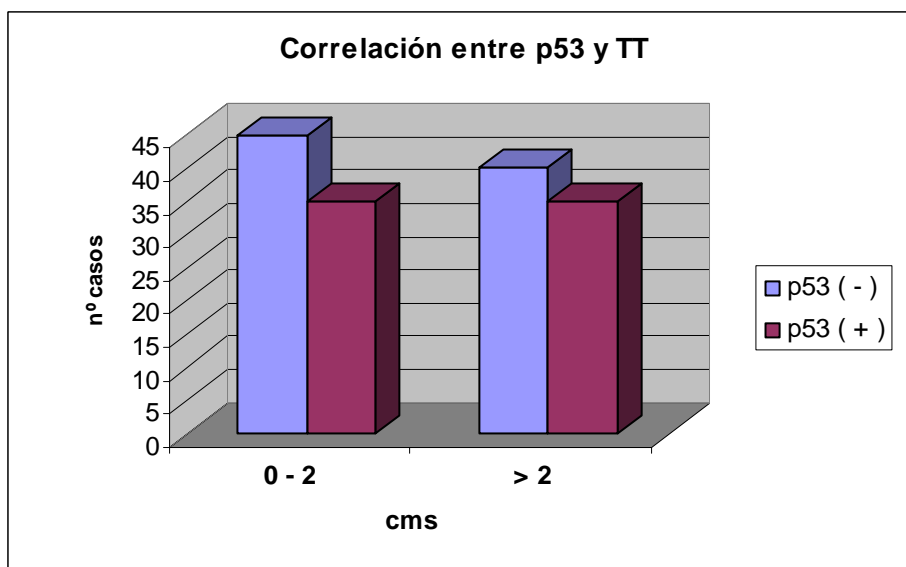
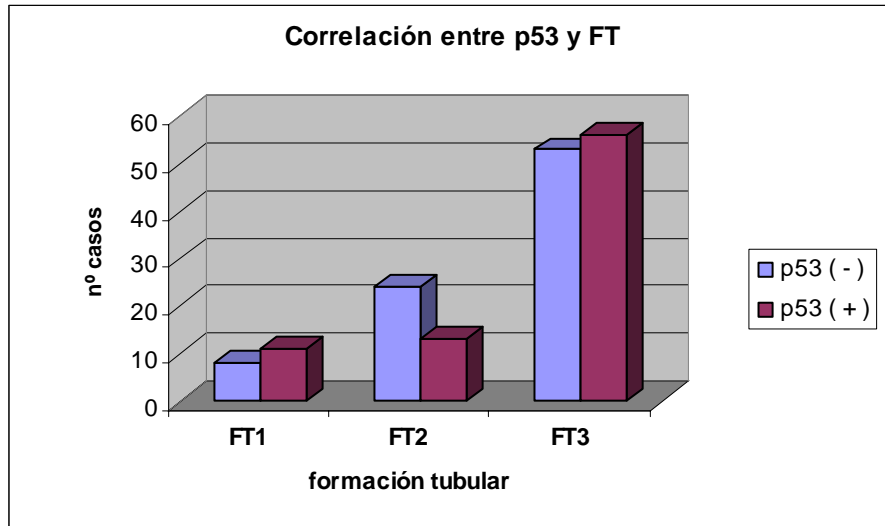


Gráfico n° 26

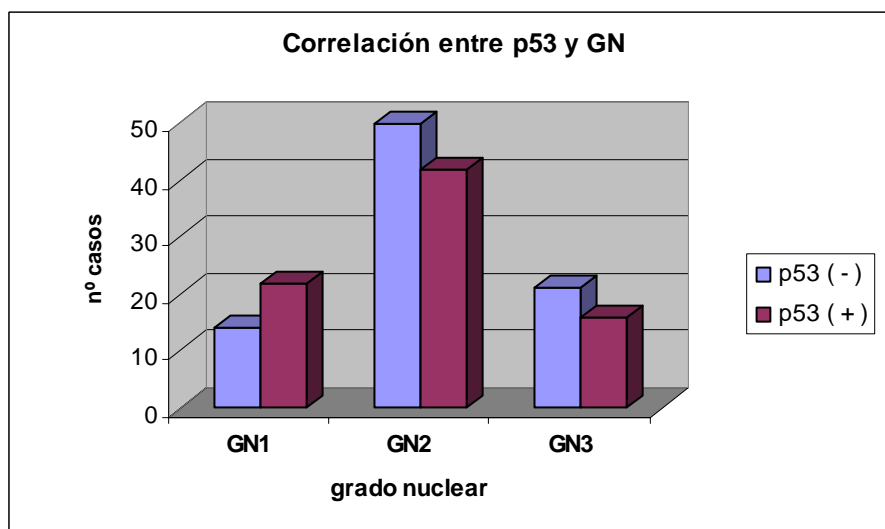




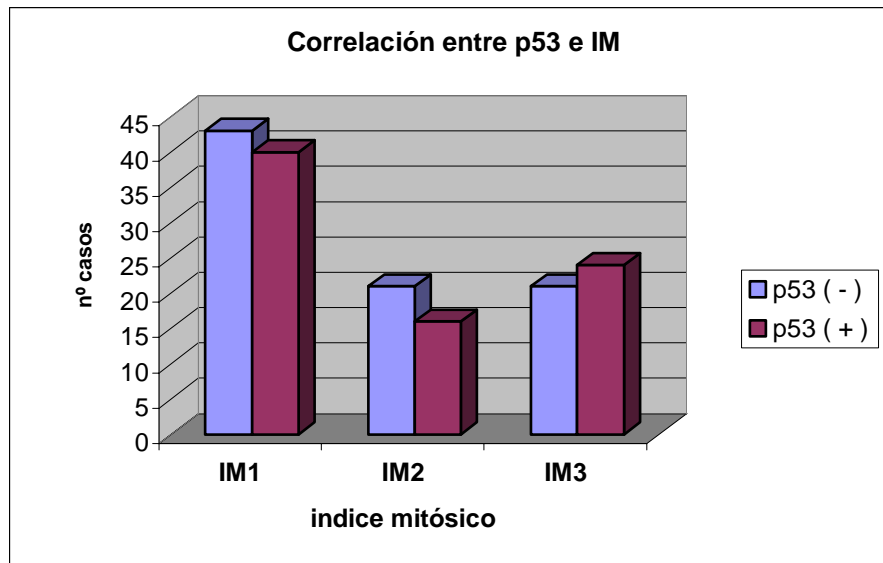
**Gráfico n° 27**



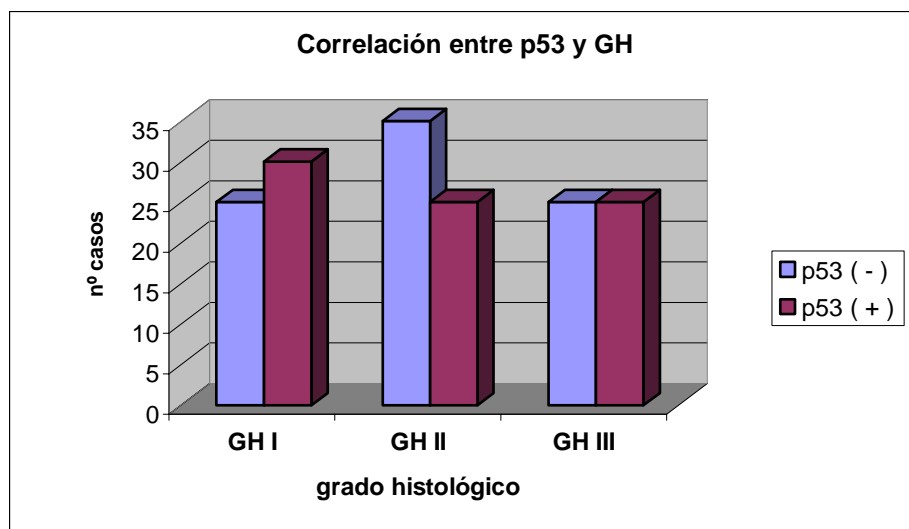
**Gráfico n° 28**



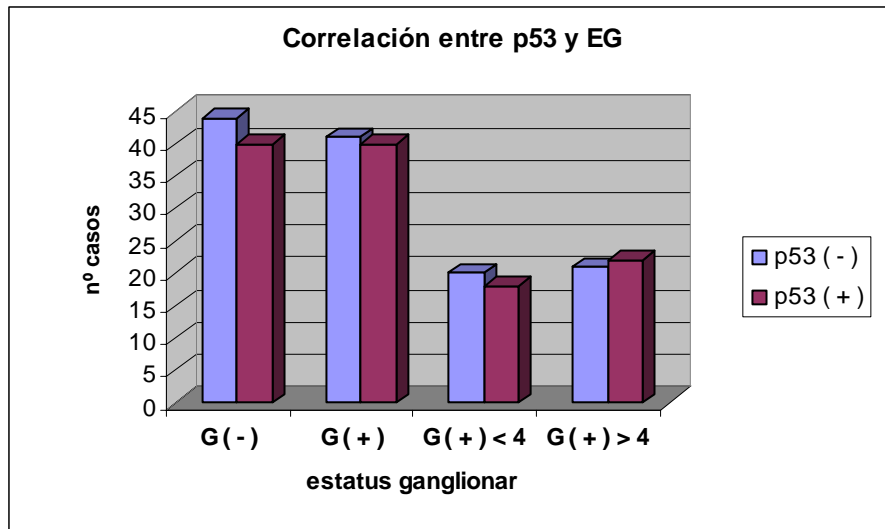
**Gráfico n° 29**



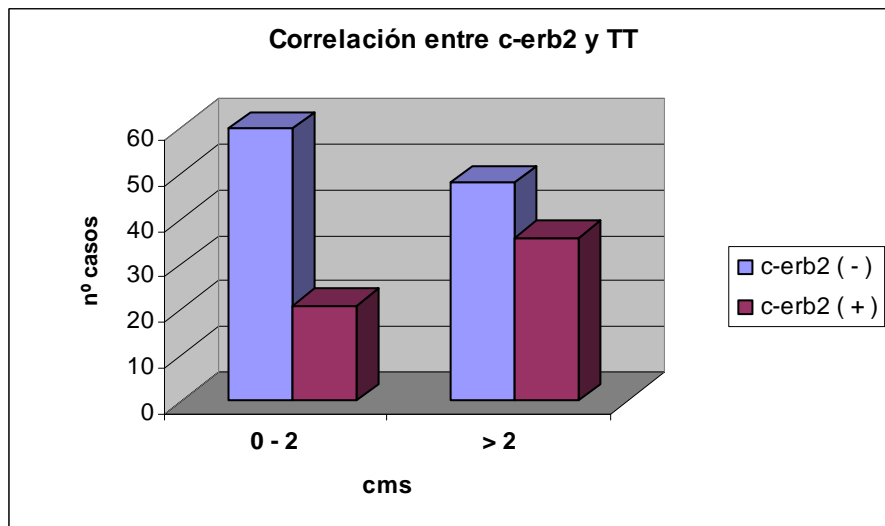
**Gráfico n° 30**



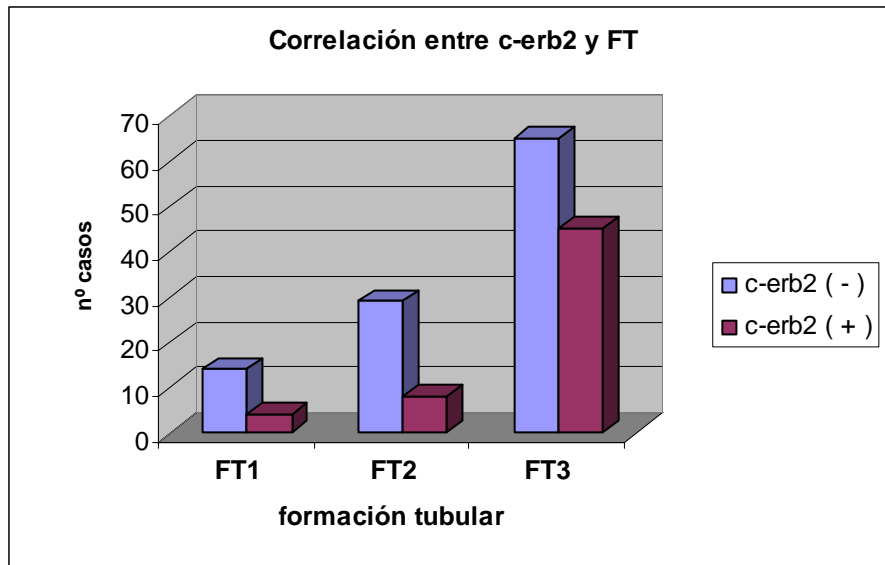
**Gráfico n° 31**



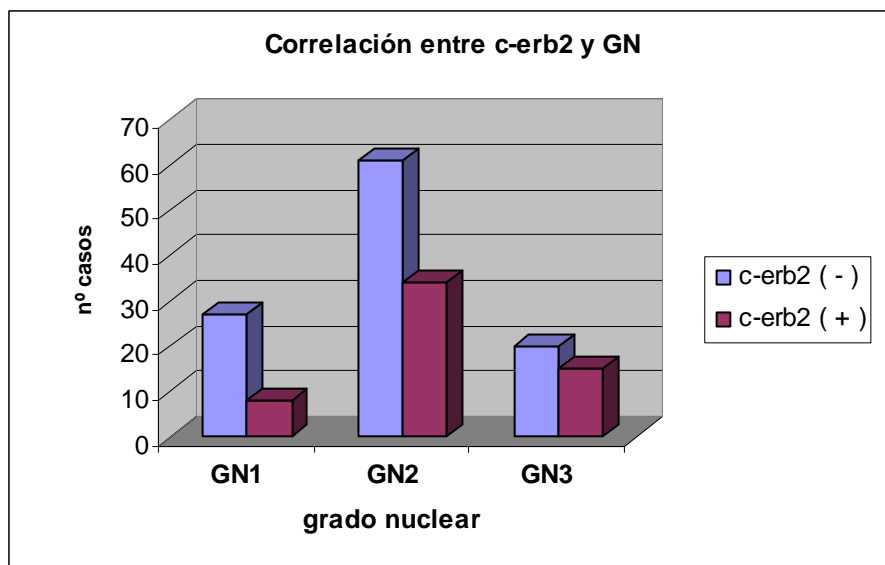
**Gráfico n° 32**



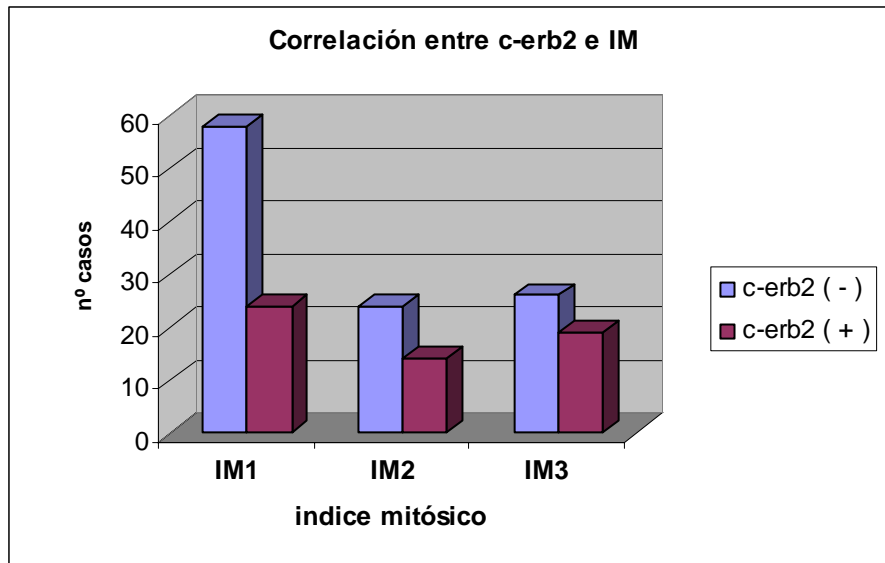
**Gráfico n° 33**



**Gráfico n° 34**



**Gráfico nº 35**



**Gráfico nº 36**

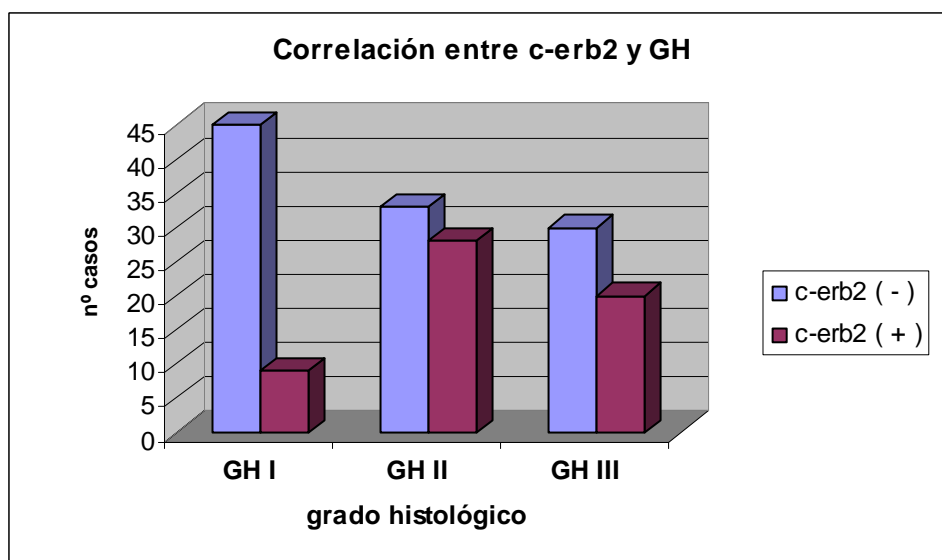


Gráfico n° 37

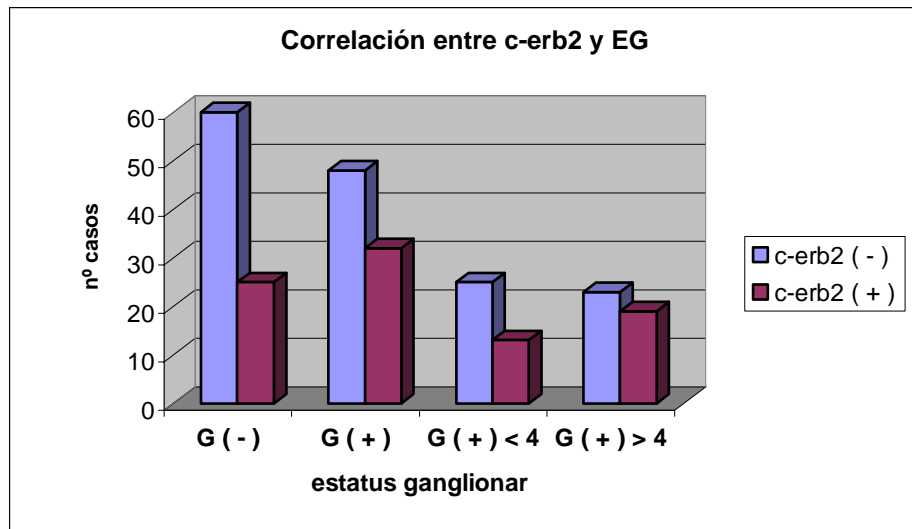


Gráfico n° 38

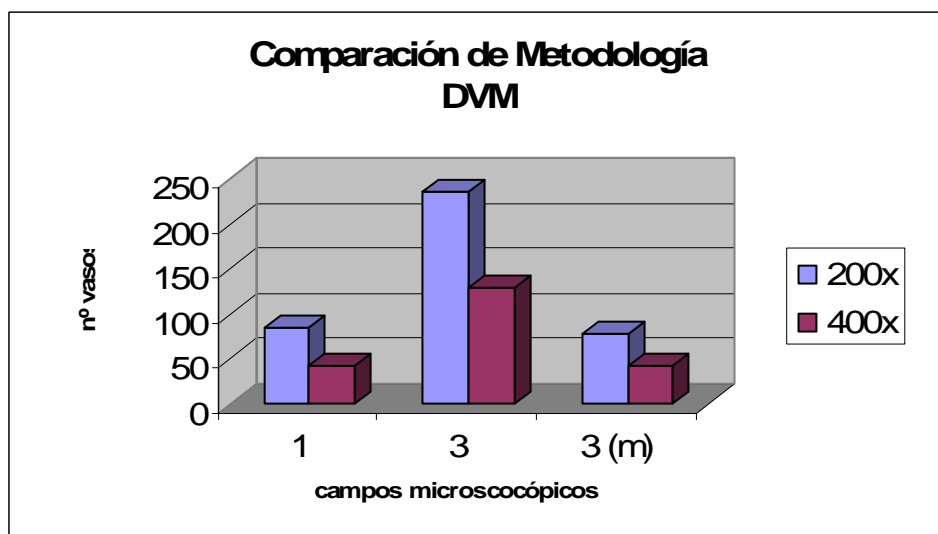
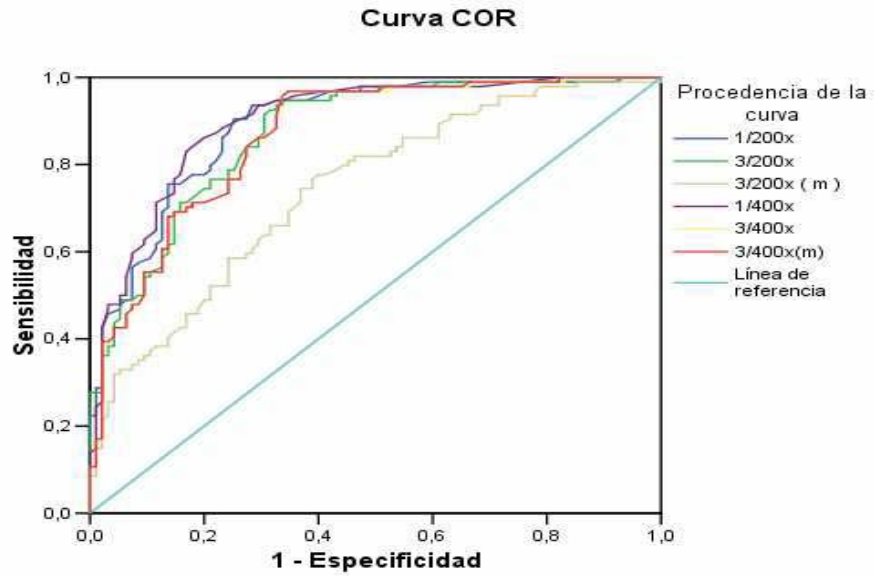
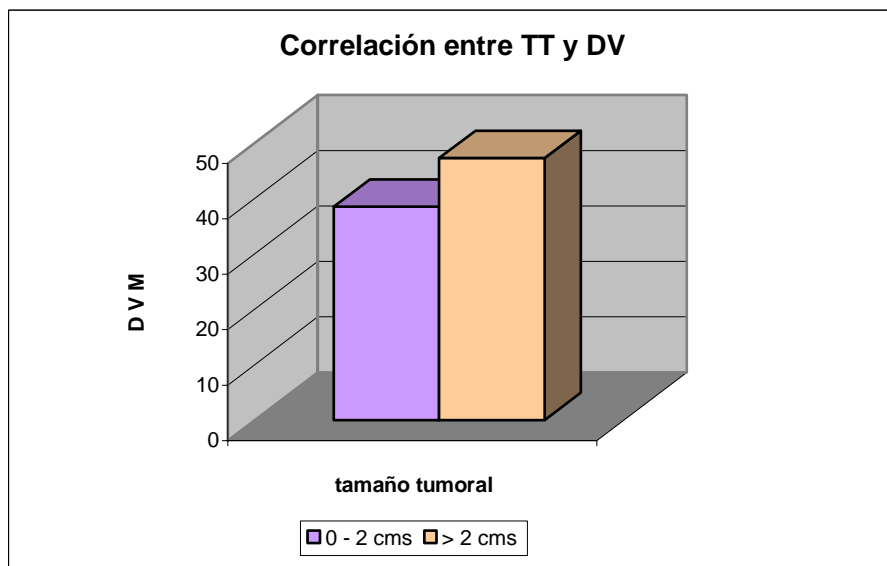


Gráfico n° 39

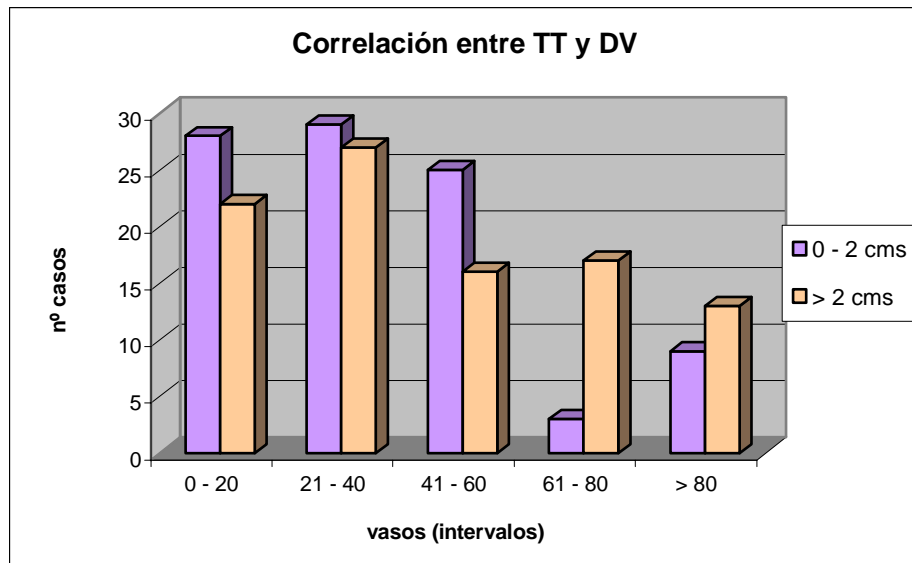


Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

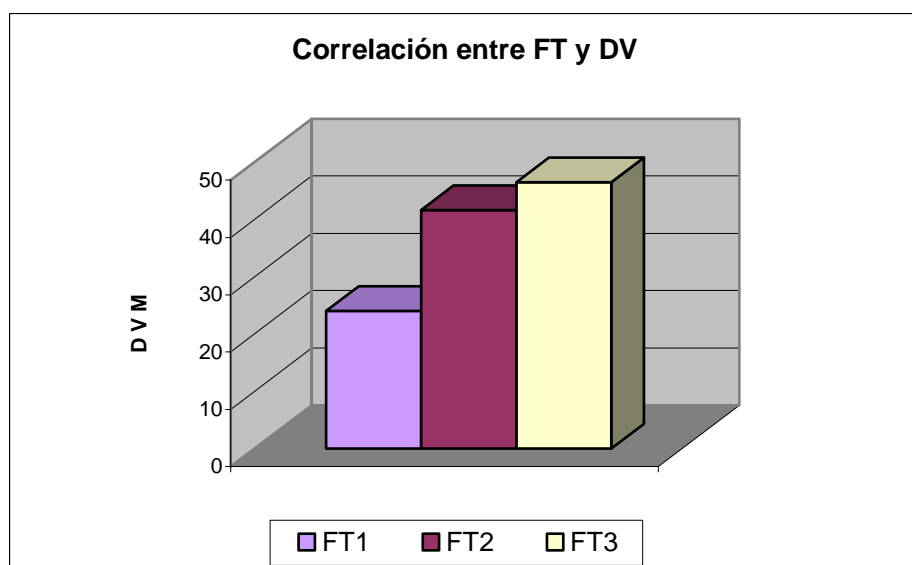
Gráfico n° 40



**Gráfico n° 41**

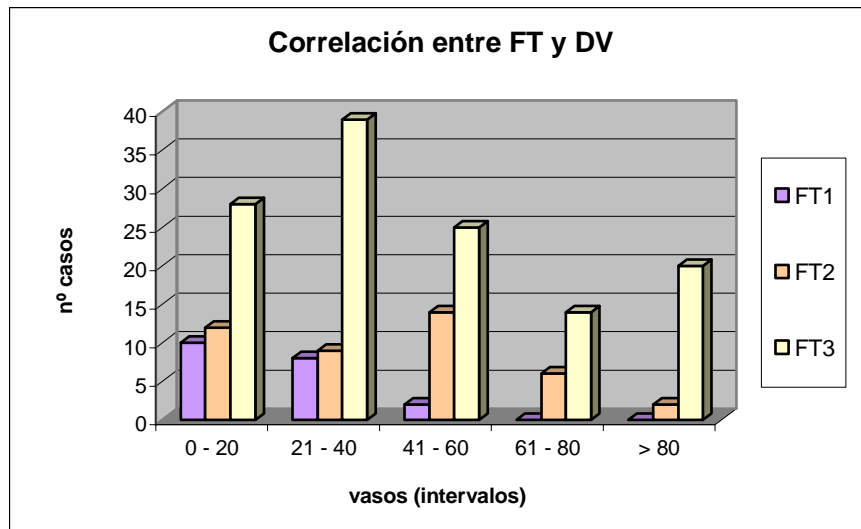


**Gráfico n° 42**





**Gráfico n° 43**



**Gráfico n° 44**

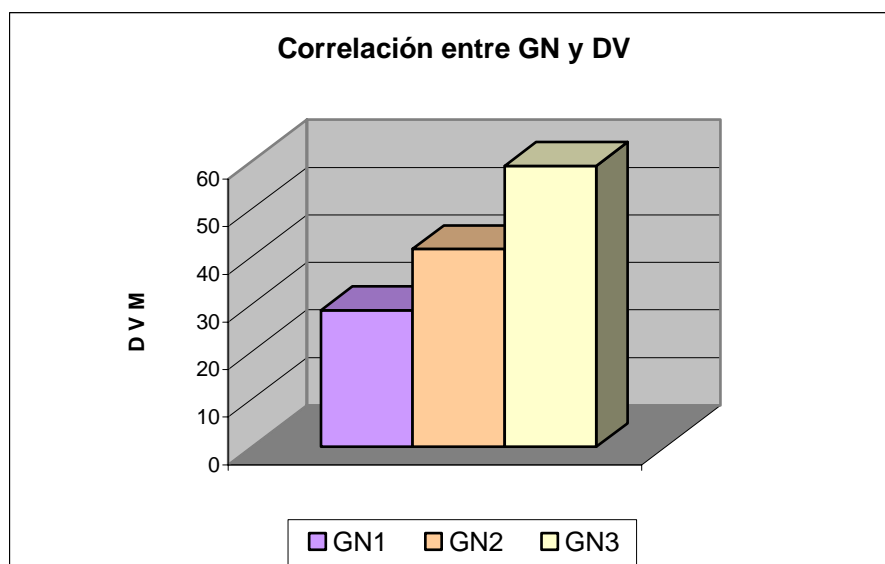


Gráfico n° 45

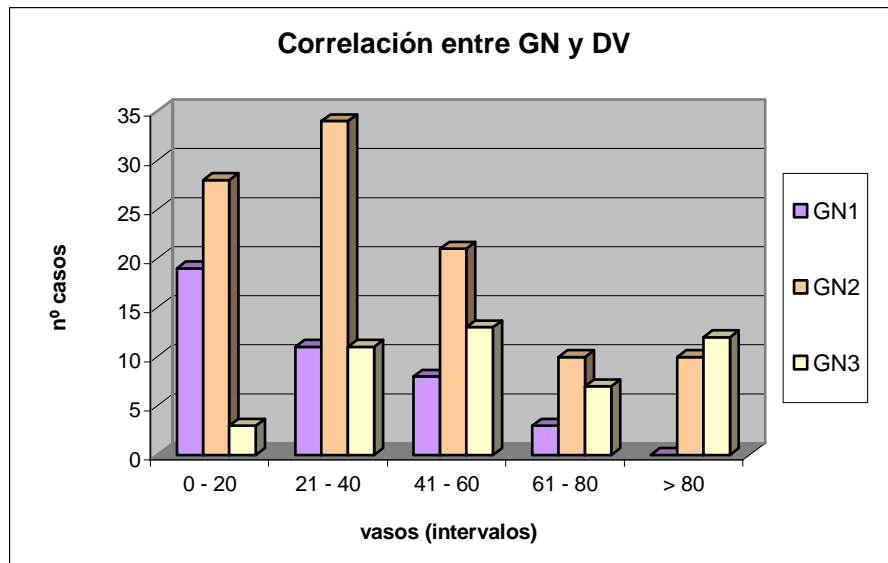


Gráfico n° 46

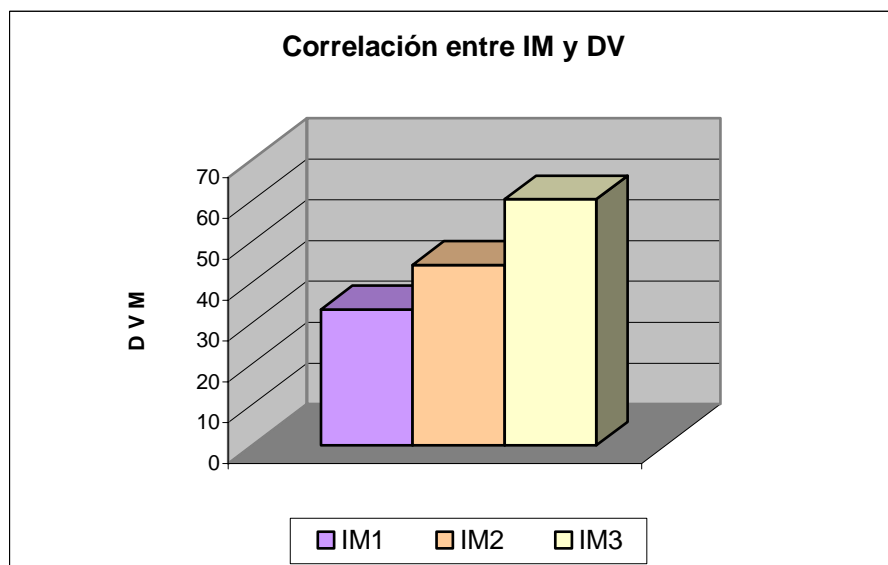


Gráfico n° 47

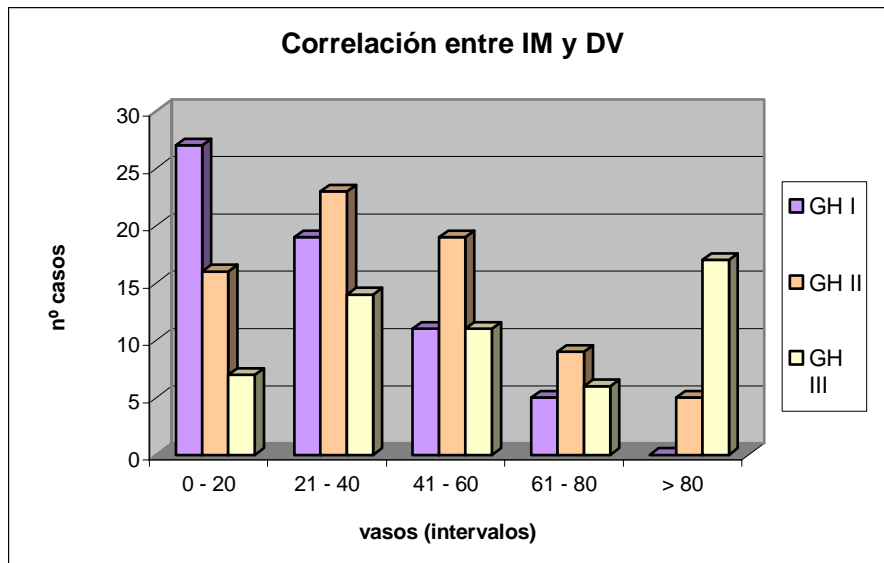
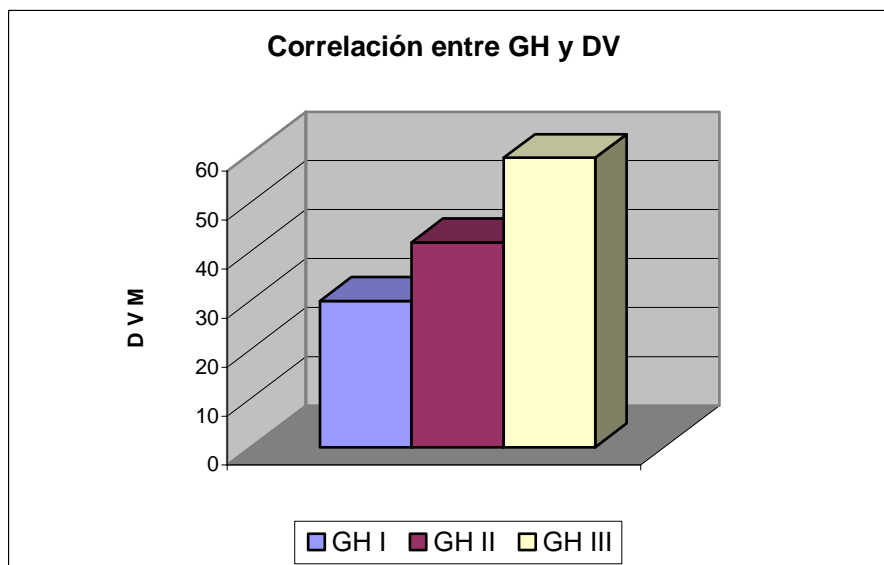
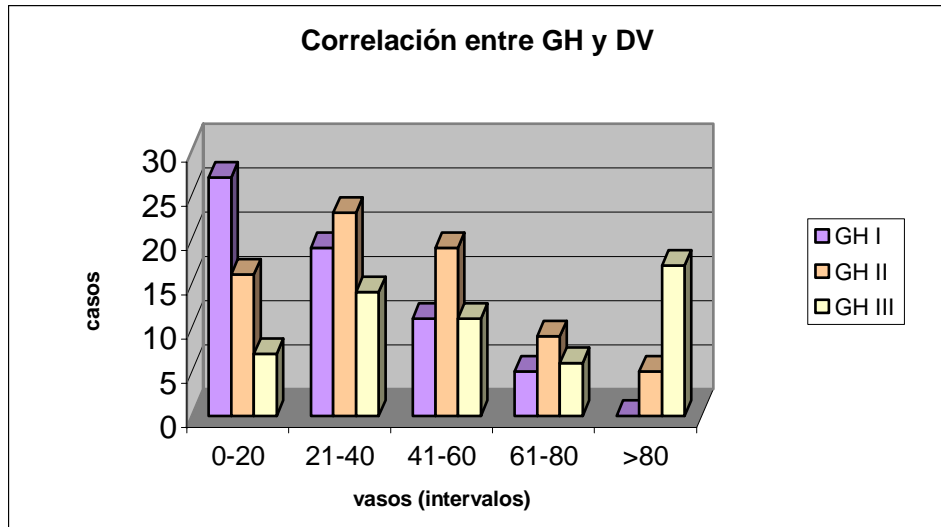


Gráfico n° 48



**Gráfico n° 49**



**Gráfico n° 50**

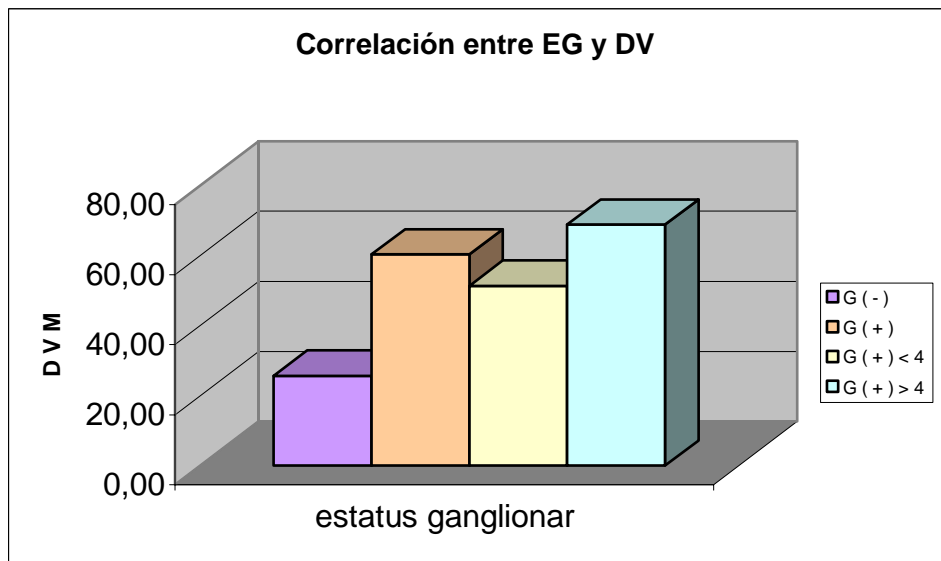


Gráfico n° 51

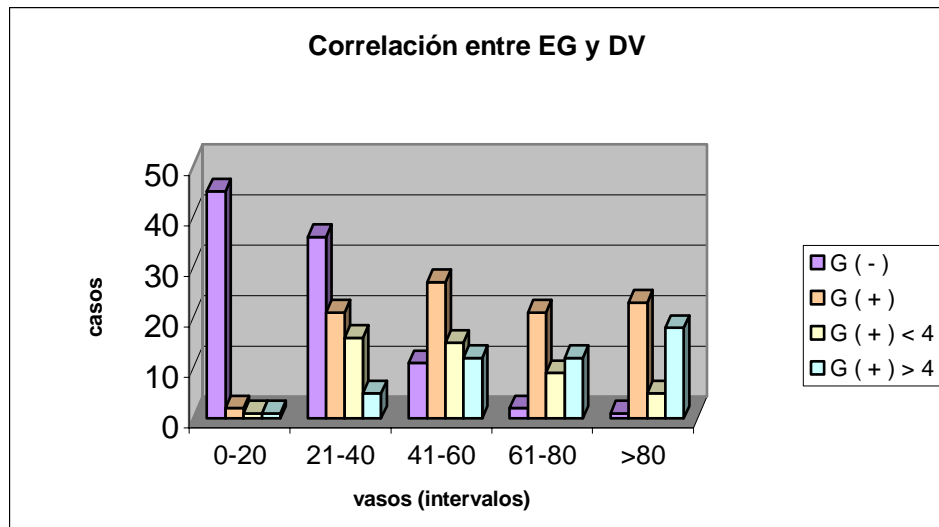


Gráfico n° 52

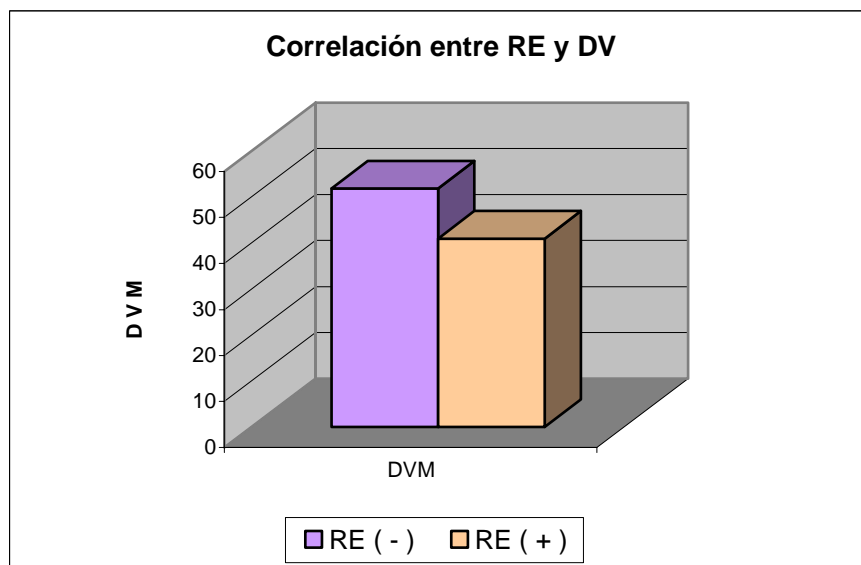


Gráfico n° 53

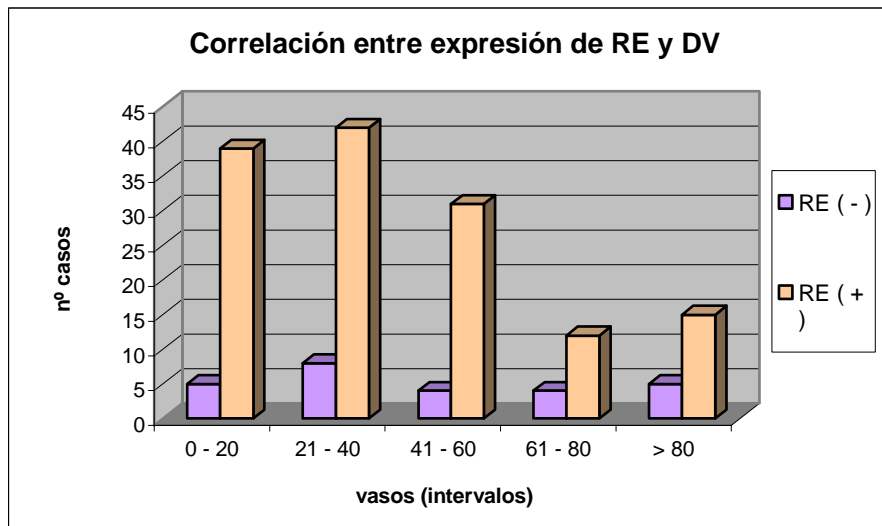


Gráfico n° 54

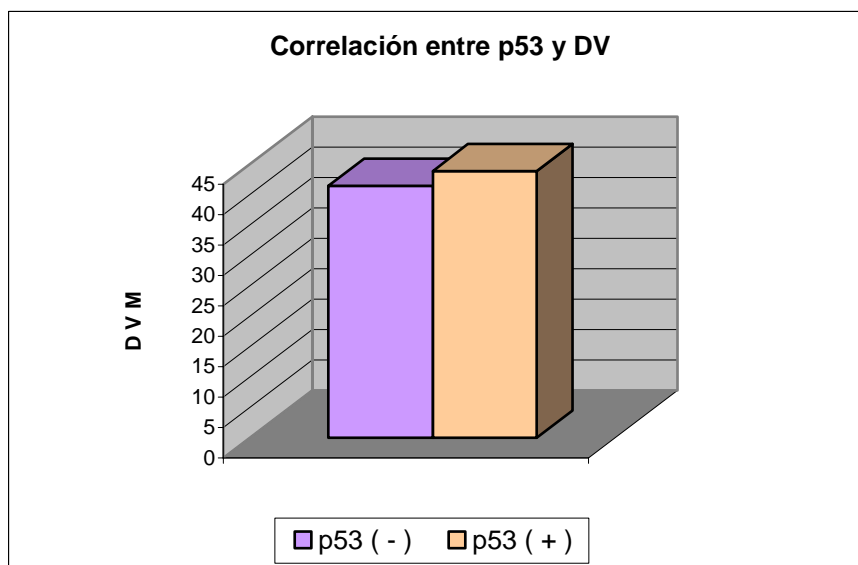


Gráfico n° 55

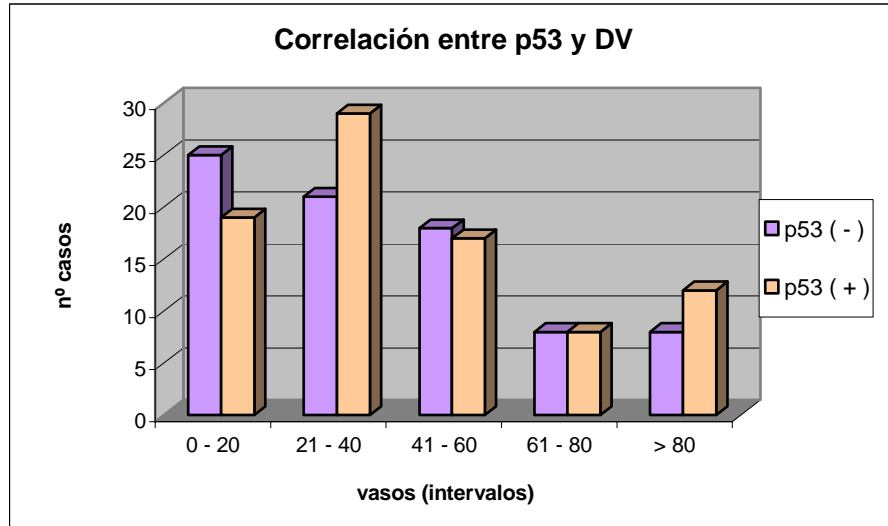


Gráfico n° 56

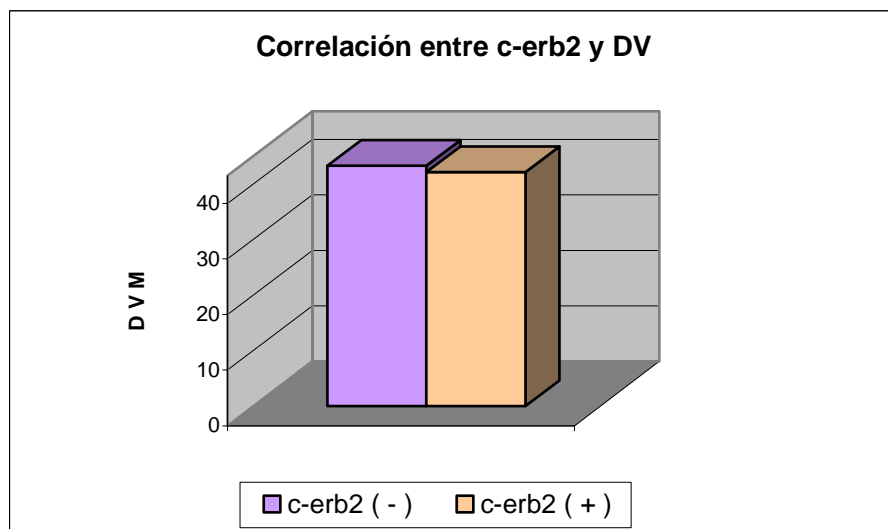
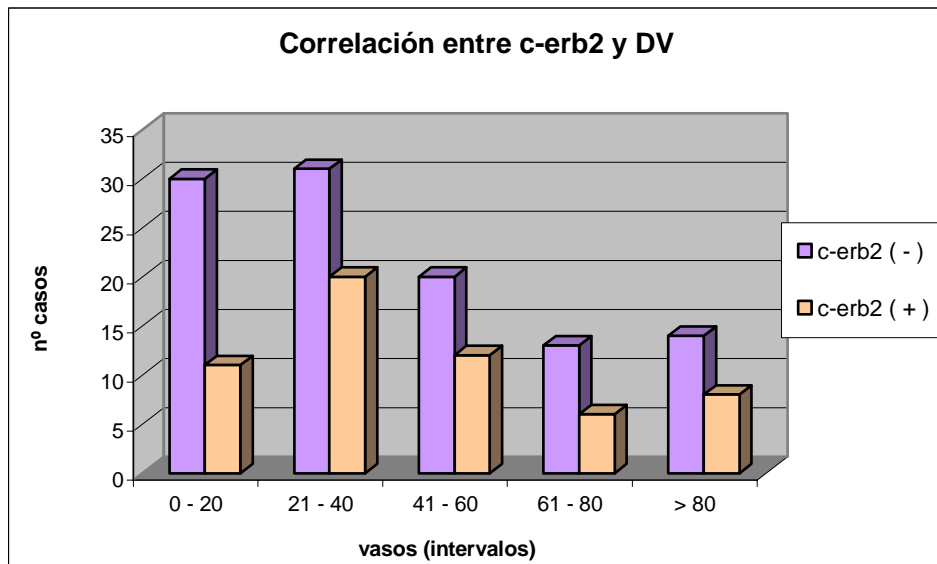
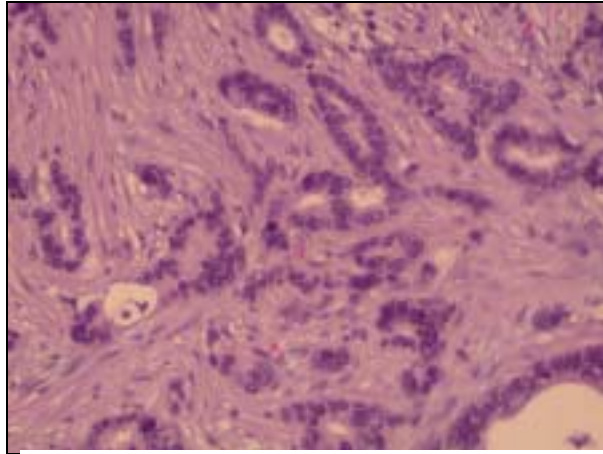


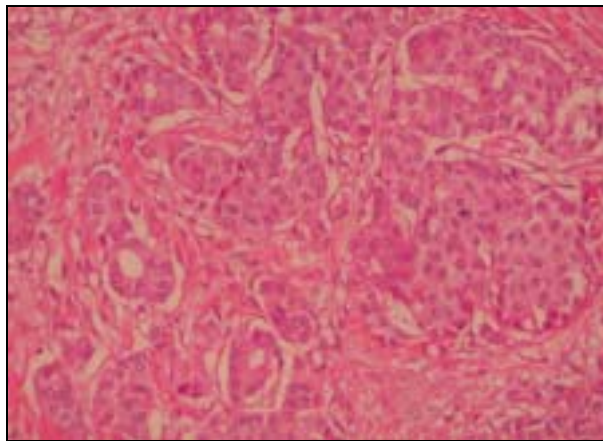
Gráfico n° 57



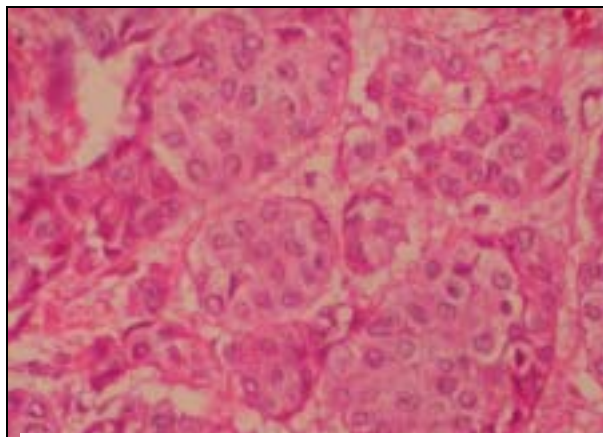




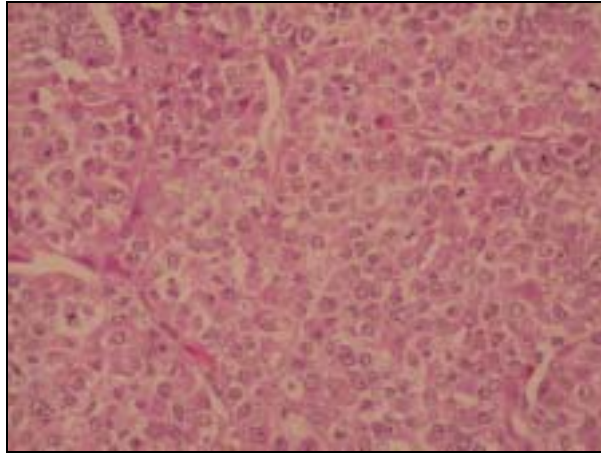
**Grado histológico I (buena formación tubular)**



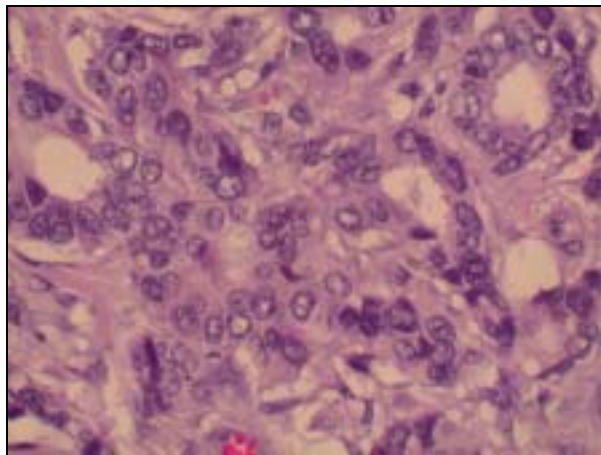
**Grado histológico II (moderada formación tubular)**



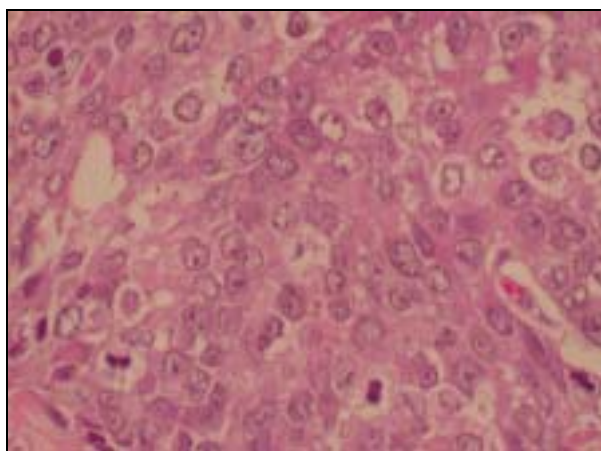
**Grado histológico III (escasa formación tubular)**



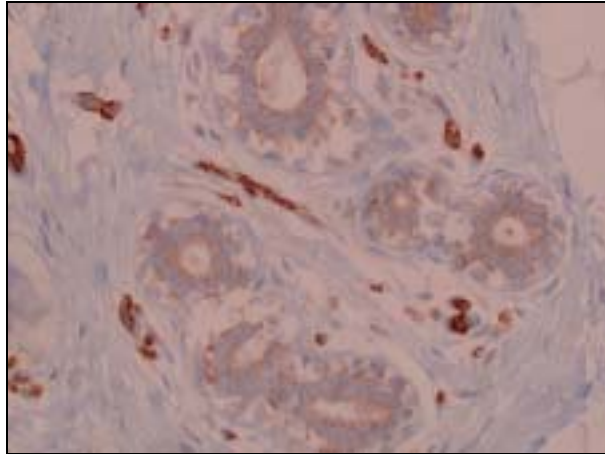
**Grado nuclear I (escasa atipia nuclear)**



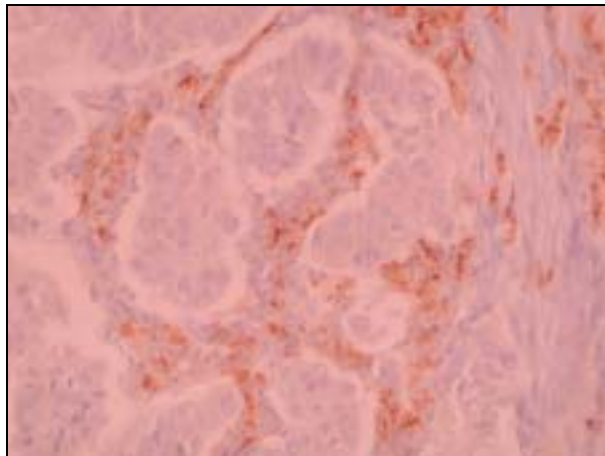
**Grado nuclear II (moderada atipia nuclear)**



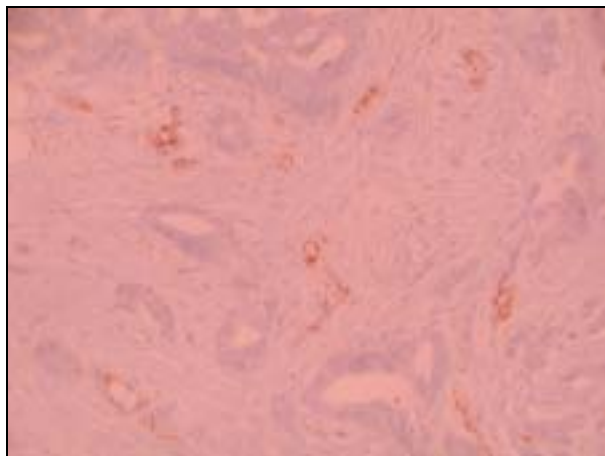
**Grado nuclear III (alta atipia nuclear)**



**Inmunotinción con CD31 (testigo)**



**Inmunotinción con CD31 (alta densidad vascular)**



**Inmunotinción con CD31 (baja densidad vascular)**